

## PART OF COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

## NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

Date of mailing (day/month/year) 07 August 2001 (07.08.01)	To:  Commissioner US Department of Commerce United States Patent and Trademark Office, PCT 2011 South Clark Place Room CP2/5C24 Arlington, VA 22202 ETATS-UNIS D'AMERIQUE in its capacity as elected Office
International application No. PCT/JP00/07917	Applicant's or agent's file reference YK0029-PCT
International filing date (day/month/year) 10 November 2000 (10.11.00)	Priority date (day/month/year) 11 November 1999 (11.11.99)
Applicant YAMAJI, Noboru et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

11 May 2001 (11.05.01)

in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

\_\_\_\_\_

2. The election  was

was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland  Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer  Antonia Muller  Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	--



## PARENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

NAGAI, Shozo  
 Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd.  
 Patent Dept.  
 17-1, Hasune 3-chome  
 Itabashi-ku, Tokyo 174-8612  
 JAPON

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

Date of mailing (day/month/year) 17 January 2001 (17.01.01)			
Applicant's or agent's file reference YK0029-PCT	<b>IMPORTANT NOTIFICATION</b>		
International application No. PCT/JP00/07917	International filing date (day/month/year) 10 November 2000 (10.11.00)		
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 11 November 1999 (11.11.99)		
Applicant YAMANOUCHI PHARMACEUTICAL CO., LTD. et al			
<p>1. The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).</p> <p>2. This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.</p> <p>3. An asterisk(*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.</p> <p>4. The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.</p>			
<u>Priority date</u> 11 Nove 1999 (11.11.99) 16 May 2000 (16.05.00)	<u>Priority application No.</u> 11/321740 2000/144020	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u> JP JP	<u>Date of receipt of priority document</u> 03 Janu 2001 (03.01.01) 03 Janu 2001 (03.01.01)

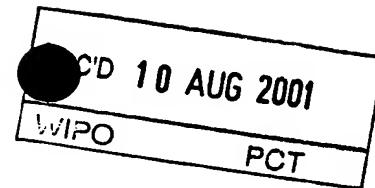
The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer Somsak Thiphakesone Telephone No. (41-22) 338.83.38
--	--



147

## 特許協力条約

PCT



## 国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)  
(PCT36条及びPCT規則70)

出願人又は代理人 の書類記号 YK0029-PCT	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/IPEA/416）を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP00/07917	国際出願日 (日.月.年) 10.11.00	優先日 (日.月.年) 11.11.99
国際特許分類 (IPC) Int. Cl' C12N 9/48, C12N 15/57, C12N 5/10, C07K 16/40, C12Q 1/34, A61K 38/48, A61P 19/02		
出願人（氏名又は名称） 山之内製薬株式会社		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条（PCT36条）の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で <u>4</u> ページからなる。
<input type="checkbox"/> この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対して訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。 (PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照) この附属書類は、全部で <u>                  </u> ページである。
3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。
I <input checked="" type="checkbox"/> 国際予備審査報告の基礎 II <input type="checkbox"/> 優先権 III <input type="checkbox"/> 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成 IV <input type="checkbox"/> 発明の單一性の欠如 V <input checked="" type="checkbox"/> PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明 VI <input checked="" type="checkbox"/> ある種の引用文献 VII <input type="checkbox"/> 国際出願の不備 VIII <input type="checkbox"/> 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 11.05.01	国際予備審査報告を作成した日 31.07.01
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官（権限のある職員） 上條 肇 4B 9453 電話番号 03-3581-1101 内線 3448



## I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。PCT規則70.16, 70.17)

出願時の国際出願書類

明細書 第 1-41 ページ、  
明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、  
明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、

出願時に提出されたもの  
国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
付の書簡と共に提出されたもの

請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、  
請求の範囲 第 1-11 項、  
請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、  
請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、

出願時に提出されたもの  
PCT19条の規定に基づき補正されたもの  
国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
付の書簡と共に提出されたもの

図面 第 1-8 ページ/図、  
図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、  
図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、

出願時に提出されたもの  
国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
付の書簡と共に提出されたもの

明細書の配列表の部分 第 1-27 ページ、  
明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、  
明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、

出願時に提出されたもの  
国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である \_\_\_\_\_ 語である。

国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語  
 PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語  
 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

この国際出願に含まれる書面による配列表  
 この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
 出願後に、この国際予備審査（または調査）機関に提出された書面による配列表  
 出願後に、この国際予備審査（または調査）機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった  
 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 振正により、下記の書類が削除された。

明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項  
 図面 図面の第 \_\_\_\_\_ ページ/図

5.  この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c)) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)



## V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条（PCT35条(2)）に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

## 1. 見解

新規性 (N)

請求の範囲 1-11 有  
請求の範囲 無

進歩性 (I S)

請求の範囲 1-11 有  
請求の範囲 無

産業上の利用可能性 (I A)

請求の範囲 1-11 有  
請求の範囲 無

## 2. 文献及び説明 (PCT規則70.7)

文献1 : C. R. FLANNERY et al., Expression of ADAMTS homologues in articular cartilage, *Biochem Biophys Res Commun.*, (1999-Jul), Vol. 260, p. 318-22

文献2 : I. ABBAZADE et al., Cloning and characterization of ADAMTS11 an aggrecanase from ADAMTS family, *J. Biol. Chem.*, (1999-Aug), Vol. 274, p. 23443-50

文献3 : M. D. TORTORELLA et al., Purification and cloning of aggrecanase-1: a member of the ADAMTS family of proteins, *Science*, (1999-Jun), Vol. 284, p. 1664-6

請求の範囲1～11に記載された発明は、国際調査報告で引用された文献1～3に対して進歩性を有する。文献1～3には配列番号1で表されるアミノ酸配列の第213番から第583番のアミノ酸配列を含むアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼが記載されておらず、しかもその点は文献1～3から当業者といえども容易に想到し得ないものである。



## VI. ある種の引用文献

## 1. ある種の公表された文書 (PCT規則70.10)

出願番号 特許番号	公知日 (日. 月. 年)	出願日 (日. 月. 年)	優先日 (有効な優先権の主張) (日. 月. 年)
WO 00/53774 A2 E, X	14.09.00	08.03.00	08.03.99

## 2. 書面による開示以外の開示 (PCT規則70.9)

書面による開示以外の開示の種類	書面による開示以外の開示の日付 (日. 月. 年)	書面による開示以外の開示に言及している 書面の日付 (日. 月. 年)



19/009332  
Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

MAR 15 2002

RECEIVED  
TECH CENTER 1600/2900

Applicant's or agent's file reference YK0029-PCT	<b>FOR FURTHER ACTION</b>	SeeNotificationofTransmittalofInternational Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)
International application No. PCT/JP00/07917	International filing date (day/month/year) 10 November 2000 (10.11.00)	Priority date (day/month/year) 11 November 1999 (11.11.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 9/48, 15/57, 5/10, C07K 16/40, C12Q 1/34, A61K 38/48, A61P 19/02		
Applicant YAMANOUCHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 4 sheets, including this cover sheet.

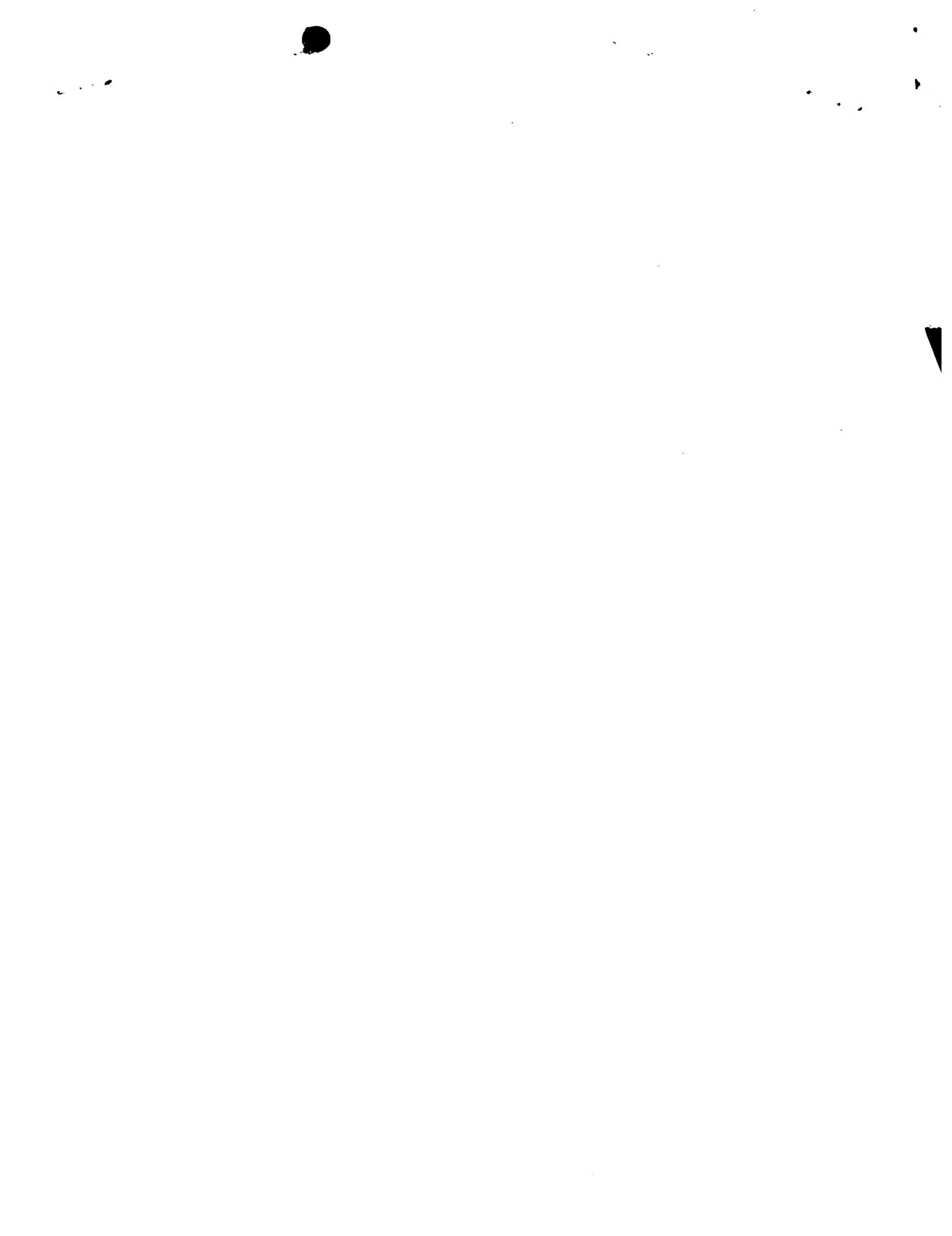
This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of \_\_\_\_\_ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I  Basis of the report
- II  Priority
- III  Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV  Lack of unity of invention
- V  Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI  Certain documents cited
- VII  Certain defects in the international application
- VIII  Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 11 May 2001 (11.05.01)	Date of completion of this report 31 July 2001 (31.07.2001)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.



## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/07917

## I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:\* the international application as originally filed the description:

pages \_\_\_\_\_, 1-41, as originally filed

pages \_\_\_\_\_, filed with the demand

pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

 the claims:

pages \_\_\_\_\_, as originally filed

pages \_\_\_\_\_, 1-11, as amended (together with any statement under Article 19)

pages \_\_\_\_\_, filed with the demand

pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

 the drawings:

pages \_\_\_\_\_, 1-8, as originally filed

pages \_\_\_\_\_, filed with the demand

pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

 the sequence listing part of the description:

pages \_\_\_\_\_, 1-27, as originally filed

pages \_\_\_\_\_, filed with the demand

pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language \_\_\_\_\_ which is:

 the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)). the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)). the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing: contained in the international application in written form. filed together with the international application in computer readable form. furnished subsequently to this Authority in written form. furnished subsequently to this Authority in computer readable form. The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished. The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.4.  The amendments have resulted in the cancellation of: the description, pages \_\_\_\_\_ the claims, Nos. \_\_\_\_\_ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_5.  This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).\*\*

\* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

\*\* Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.



**V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement****1. Statement**

Novelty (N)	Claims	1-11	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-11	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-11	YES
	Claims		NO

**2. Citations and explanations**

Document 1: C.R. Flannery et al., Expression of ADAMTS homologues in articular cartilage, *Biochem Biophys Res. Commun.* (July 1999), Vol. 260, pages 318-322

Document 2: I. Abbazade et al., Cloning and characterization of ADAMTS11, an aggrecanase from ADAMTS family, *J. Biol. Chem.* (August 1999), Vol. 274, pages 23443-23450

Document 3: M.D. Tortorella et al., Purification and cloning of aggrecanase-1: a member of the ADAMTS family of proteins, *Science* (June 1999), Vol. 284, pages 1664-1666

The subject matters of claims 1-11 appear to involve an inventive step in view of documents 1-3 cited in the ISR. Documents 1-3 do not describe the metalloprotease having aggrecanase activity containing the amino acid sequences No. 213 to 583 of the amino acid sequences represented by Sequence ID No. 1 and a person skilled in the art could not have easily arrived at the invention on the basis of documents 1-3.



**INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT**

International application No.

PCT/JP00/07917

**VI. Certain documents cited**

## 1. Certain published documents (Rule 70.10)

Application No. Patent No.	Publication date (day/month/year)	Filing date (day/month/year)	Priority date (valid claim) (day/month/year)
WO 00/53774 A2	14 September 2000 (14.09.2000)	08 March 2000 (08.03.2000)	08 March 1999 (08.03.1999)
E,X			

## 2. Non-written disclosures (Rule 70.9)

Kind of non-written disclosure	Date of non-written disclosure (day/month/year)	Date of written disclosure referring to non-written disclosure (day/month/year)



E P

U S

## 特許協力条約

P C T

## 国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)  
〔P C T 18条、P C T規則43、44〕

出願人又は代理人 の書類記号 YK0029-PCT	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(P C T / I S A / 2 2 0)及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 P C T / J P 0 0 / 0 7 9 1 7	国際出願日 (日.月.年) 10.11.00	優先日 (日.月.年) 11.11.99
出願人(氏名又は名称) 山之内製薬株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(P C T 18条)の規定に従い出願人に送付する。  
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

## 1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。  
 この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。  
 この国際出願に含まれる書面による配列表  
 この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表  
 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
 出願後に提出した書面による配列表が、出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。  
 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2.  請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3.  発明の單一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は  出願人が提出したものと承認する。

次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は  出願人が提出したものと承認する。

第III欄に示されているように、法施行規則第47条(P C T規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第\_\_\_\_\_図とする。  出願人が示したとおりである。

なし

出願人は図を示さなかった。

本図は発明の特徴を一層よく表している。



## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C12N 9/48, C12N 15/57, C12N 5/10, C07K 16/40, C12Q 1/34, A61K 38/48, A61P 19/02

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C12N 9/48, C12N 15/57, C12N 5/10, C07K 16/40, C12Q 1/34, A61K 38/48, A61P 19/02

## 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

## 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS, CAS ONLINE, DDBJ/GenBank/EMBL/Geneseq

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Flannery CR et al. "Expression of ADAMTS homologues in articular cartilage." Biochem Biophys Res Commun. 第260巻 (1999 Jul) p. 318-22.	1-11
X	Abbaszade I et al. "Cloning and characterization of ADAMTS11, an aggrecanase from the ADAMTS family." J Biol Chem. 第274巻 (1999 Aug) p. 23443-50.	1-11
X	Tortorella MD et al. "Purification and cloning of aggrecanase -1: a member of the ADAMTS family of proteins."	1-11

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
 「&」同一パテントファミリー文献

## 国際調査を完了した日

06.02.01

## 国際調査報告の発送日

06.03.01

## 国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

## 特許庁審査官 (権限のある職員)

加藤 浩

印

印

4B

印

9050

印

電話番号 03-3581-1101 内線 3448



## C (続き) 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
	Science. 第284巻 (1999 Jun) p. 1664-6.	



(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2001年5月17日 (17.05.2001)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 01/34785 A1

(51) 国際特許分類<sup>7</sup>: C12N 9/48, 15/57, 5/10, C07K 16/40,  
C12Q 1/34, A61K 38/48, A61P 19/02

(21) 国際出願番号: PCT/JP00/07917

(22) 国際出願日: 2000年11月10日 (10.11.2000)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願平11/321740  
1999年11月11日 (11.11.1999) JP

特願平2000-144020  
2000年5月16日 (16.05.2000) JP

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 山之内製薬株式会社 (YAMANOUCHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒103-8411 東京都中央区日本橋本町二丁目3番11号 Tokyo (JP). 財団法人 かずさディー・エヌ・エー研究所 (KAZUSA DNA RESEARCH INSTITUTE) [JP/JP]; 〒292-0812 千葉県木更津市矢那1532番3 Chiba (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 山地 昇 (YAMAJI, Noboru) [JP/JP]. 西村耕一 (NISHIMURA, Kouichi) [JP/JP]. 阿部邦威 (ABE, Kunitake) [JP/JP];

〒305-8585 茨城県つくば市御幸が丘21 山之内製薬株式会社内 Ibaraki (JP). 小原 収 (OHARA, Osamu) [JP/JP]; 〒292-0801 千葉県木更津市諸西二丁目20番25号 Chiba (JP). 長瀬隆弘 (NAGASE, Takahiro) [JP/JP]; 〒292-0042 千葉県木更津市清見台南二丁目6番5号 Chiba (JP). 野村信夫 (NOMURA, Nobuo) [JP/JP]; 〒292-0814 千葉県木更津市八幡台五丁目2番11号 Chiba (JP).

(74) 代理人: 長井省三, 外 (NAGAI, Shozo et al.); 〒174-8612 東京都板橋区蓮根三丁目17番1号 山之内製薬株式会社 特許部内 Tokyo (JP).

(81) 指定国(国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) 指定国(広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:  
— 國際調査報告書

/統葉有/

(54) Title: NOVEL METALLOPROTEASE HAVING AGGREGANASE ACTIVITY

(54) 発明の名称: アグリカナーゼ活性を有する新規な金属プロテアーゼ

(57) Abstract: A novel metalloprotease having an aggrecanase activity which causes joint diseases; a gene encoding this metalloprotease; a promoter of the above metalloprotease; a method of screening a drug with the use of the above metalloprotease; and compositions for inhibiting the degradation of proteoglycans which contain as the active ingredient a substance inhibiting the aggrecanase activity of the above metalloprotease.

(57) 要約:

WO 01/34785 A1

本発明は関節疾患の原因となる、アグリカナーゼ活性を有する新規金属プロテアーゼ、該金属プロテアーゼをコードする遺伝子、該金属プロテアーゼのプロモーター、該金属プロテアーゼを用いた医薬のスクリーニング法、該金属プロテアーゼのアグリカナーゼ活性を阻害する物質を有効成分とするプロテオグリカン分解抑制用組成物を提供する。



— 補正書・説明書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

## 明細書

## アグリカナーゼ活性を有する新規な金属プロテアーゼ

技術分野

本発明は、関節疾患の原因となるアグリカナーゼ活性を有する新規金属プロテアーゼ（以下、「関節疾患アグリカナーゼ」とする）、該「関節疾患アグリカナーゼ」をコードする遺伝子、該「関節疾患アグリカナーゼ」の製造方法、該「関節疾患アグリカナーゼ」を用いた、アグリカナーゼ活性を阻害する物質のスクリーニング方法、該アグリカナーゼ活性を阻害する物質を有効成分とするプロテオグリカン分解抑制用医薬組成物、及び該「関節疾患アグリカナーゼ」のプロモーター遺伝子に関するものである。

背景技術

関節疾患は、関節軟骨の損傷・変性を主病変とする疾患である。関節疾患の中で最も患者数の多い疾患は変形性関節症（OA）であるが、現行の治療法においては鎮痛消炎剤やヒアルロン酸製剤が軟骨変性・軟骨下骨破壊に伴う痛みを軽減する目的で対症療法的に用いられているに過ぎず、十分な治療効果を上げているとは言えない状況にある。

関節軟骨は主にII型コラーゲンと軟骨特異的プロテオグリカンであるアグリカンから構成される組織であり、関節疾患では両者の分解・変性が観察されている。そのため、古くよりこれら細胞外マトリクス成分の分解・変性の制御が関節疾患の治療に繋がると考えられており、分解に関与するプロテアーゼ（コラゲナーゼ、アグリカナーゼ）の同定、そして、それらに対する阻害剤の探索、医薬品としての開発の試みが精力的に行われてきた。

コラゲナーゼ活性を有するプロテアーゼとしてはマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP1、MMP8、MMP13、MMP14等) が同定され、それぞれの選択的阻害剤が発見されていた。しかしながら、多数のコラゲナーゼ阻害活性を有する MMP 阻害剤をOA、リューマチ性関節炎 (RA) を含む関節疾患治療薬として開発する動きがあったにもかかわらず、これらの疾患を適応症とする MMP 阻害剤は上市されていなかった。このような状況下、関節軟骨のもう一つの主要構成成分であるアグリカンを選択的に分解するアグリカナーゼが注目された。

アグリカンの Glu<sup>373</sup>-Ala<sup>374</sup> の間を切断する酵素アグリカナーゼが関節疾患に関与することは、Sandy らや Lohmander らのヒト関節疾患患者の滑液中に検出される主要なアグリカン分解断片がいずれもアグリカナーゼ切断部位での切断により生じているとした論文で明らかにされていた (Sandy J. D. et al., J Clin. Invest. 89, 1512-1516, 1992; : Lohmander L. S. et al., Arthritis Rheum. 36, 1214-1222, 1993)。一方、関節軟骨の体外移植培養系において、IL-1 誘導により、まずアグリカンの分解が起こり、続いて II 型コラーゲンの分解が亢進することが知られていた (Dingle L. T. et al., Ann. Rheum. Dis. 34, 303-311, 1975; Cawston T. E. et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 215, 377-385, 1995; Kozaci L. D. et al., Arthritis Rheum. 40, 164-174, 1997)。マウス関節炎モデルにおいてもアグリカン分解が II 型コラーゲン分解に先行することが報告されていた (van Meurs J. B. et al., Arthritis Rheum., 42, 1128-1139, 1999)。これらのこととは、先行するアグリカン分解を阻害することにより II 型コラーゲン分解をも制御しうる可能性を示唆していた。

ところが、金属プロテアーゼであること、細胞外に存在すること、基質認識に糖鎖の関与があること、IL-1、TNF、レチノイン酸で活性が誘導されること等の生化学的性質が分かっていたにも係わらず、関節疾患の原因となるアグリカナーゼ（「関節疾患アグリカナーゼ」）の本体は長い間不明のままであった。最近になり、ADAMTS4 (aggrecanase-1: Tortorella M. D. et al., Science., 284,

1664-1666, 1999)、ADAMTS11 (aggrecanase-2: Abbaszade I, et al., J. Biol. Chem., 274, 23443-23450, 1999) がアグリカナーゼ活性を有するプロテアーゼとして報告された。しかし、これらはヒトOA軟骨で遺伝子発現増強されておらず、また、ヒト膝関節軟骨の体外移植培養系において、関節疾患の原因となるアグリカナーゼ活性を誘導する IL-1、TNF、レチノイン酸で遺伝子発現誘導されないことから、「関節疾患アグリカナーゼ」ではないことが判明した。(Flannery C. R. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 260, 318-322, 1999)。上述の通り、「関節疾患アグリカナーゼ」は、未だ取得されていない。

### 本発明の開示

このような状況下、本発明者らは銳意検討した結果、「関節疾患アグリカナーゼ」である、アグリカナーゼ活性を有する新規な金属プロテアーゼをコードする遺伝子を単離し、全長ORF配列を決定して、組み換え蛋白の生産を可能にすることに成功した。

さらにまた、該遺伝子を含むベクター、該ベクターを含む宿主細胞、該宿主細胞を用いた同新規蛋白の製造法を確立した。

また、本発明者らは、該蛋白を用いたスクリーニング法を提供し、当該スクリーニング法を実施し、選択された化合物が「アグリカナーゼ活性」（即ち、該蛋白が有する細胞外基質アグリカンを Glu<sup>373</sup>-Ala<sup>374</sup> の間で選択的に切断する活性）を有意に阻害し、関節疾患の予防及びまたは治療に有用な医薬品となり得ることを見出した。

さらに関節疾患の予防及びまたは治療用医薬品のスクリーニングに有用な、該蛋白のプロモーター遺伝子を単離し、本発明を完成させた。

即ち本発明は、

〔1〕配列番号1で表されるアミノ酸配列の第213番から第583番のアミノ酸

配列を含むアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物、

[2] 配列番号1で表されるアミノ酸配列の第1番から第583番のアミノ酸配列を含むアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物、

[3] 配列番号1で表されるアミノ酸配列、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第1番から第687番のアミノ酸配列、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第1番から第583番のアミノ酸配列、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第213番から第950番のアミノ酸配列、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第213番から第687番のアミノ酸配列、若しくは、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第213番から第583番のアミノ酸配列を有するアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物、

[4] [1]乃至[3]の何れかに記載のアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物のアミノ酸配列をコードする遺伝子、

[5] [4]に記載の遺伝子を含むベクター、

[6] [5]に記載のベクターを含む宿主細胞、

[7] [6]に記載の宿主細胞を用いることを特徴とする、[1]乃至[3]の何れかに記載のアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物の製造方法、

[8] [1]乃至[3]の何れかに記載のアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物に対する抗体、

[9] [1]乃至[3]の何れかに記載のアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物と被験化合物とを接触させることを特徴とする、当該金属プロテアーゼのアグリカナーゼ活性を阻害する物質をスクリーニングする方法、

-5-

[10] [1] 乃至 [3] に記載のアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物を阻害する物質を有効成分とするプロテオグリカン分解抑制用医薬組成物、

[11] 配列番号 24、25、26、27、28、29、30 若しくは 31 で表される遺伝子、又は該遺伝子の同効物、

に関する。

あるいは本発明は、プロテオグリカン分解抑制用医薬の製造における、[1] 乃至 [3] の何れかに記載のアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物のアグリカナーゼ活性を阻害する物質の使用に関する。

さらに本発明は、[9] に記載のスクリーニング方法によって得ることができる、当該アグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物を阻害する物質の、関節疾患治療における使用に関する。

また、本発明は [11] に記載の遺伝子を用い、当該遺伝子のプロモーター活性を修飾する物質のスクリーニング方法に関する。

### 発明の実施の形態

以下、本発明で使用される用語について説明する。本明細書中で使用される「アグリカナーゼ」は、亜鉛配位コンセンサス配列(HExxH)を有し、かつ、関節軟骨に存在するアグリカンを Glu<sup>373</sup>-Ala<sup>374</sup> の間で選択的に切断する活性、即ち「アグリカナーゼ活性」を有する金属プロテアーゼを意味する。また、「アグリカナーゼ」は断りがない限り、「蛋白」を表す。

本発明の「関節疾患アグリカナーゼ」は、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の第 213 番から第 583 番のアミノ酸配列を含むアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物ならいざれでもよい。

また、好ましくは本発明の「関節疾患アグリカナーゼ」は、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第1番から第583番のアミノ酸配列を含むアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物である。

さらに好ましくは、配列番号1で表されるアミノ酸配列、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第1番から第687番のアミノ酸配列、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第1番から第583番のアミノ酸配列、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第213番から第950番のアミノ酸配列、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第213番から第687番のアミノ酸配列、若しくは、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第213番から第583番のアミノ酸配列を有するアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物である。

ここで、「金属プロテアーゼの同効物」とは、(1)配列番号1で表されるアミノ酸配列の第213番から第583番のアミノ酸配列を含む金属プロテアーゼの同効物の場合、第213番から第583番のアミノ酸配列の中のいずれかの1乃至複数個(好ましくは1~10個、より好ましくは1~5個)の部位において、1乃至複数個(好ましくは1~10個、より好ましくは1~5個)のアミノ酸残基が置換、欠失、及び/または挿入されていて、かつ、アグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ、(2)配列番号1で表されるアミノ酸配列の第1番から第583番のアミノ酸配列を含む金属プロテアーゼの同効物の場合、第1番から第583番のアミノ酸配列の中のいずれかの1乃至複数個(好ましくは1~10個、より好ましくは1~5個)のアミノ酸残基が置換、欠失、及び/または挿入されていて、かつ、アグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ、(3)配列番号1で表されるアミノ酸配列、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第1番から第687番のアミノ酸配列、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第1番から第583番のアミノ酸配列、配列番号1で表されるアミノ酸

配列の第 213 番から第 950 番のアミノ酸配列、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の第 213 番から第 687 番のアミノ酸配列、若しくは、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の第 213 番から第 583 番のアミノ酸配列を有する金属プロテアーゼの同効物の場合、それぞれの配列の中のいずれかの 1 乃至複数個（好ましくは 1 ～ 10 個、より好ましくは 1 ～ 5 個）の部位において、1 乃至複数個（好ましくは 1 ～ 10 個、より好ましくは 1 ～ 5 個）のアミノ酸残基が置換、欠失、及び／または挿入されていて、かつ、アグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼである。

本発明の「関節疾患アグリカナーゼ」の起源はヒトに限定されない。例えば、ヒト以外の生物（例えば、マウス、ラット、ハムスター、又はイヌ）由来の関節疾患の原因となるアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼが含まれる。また、配列番号 1 に記載した「関節疾患アグリカナーゼ」の配列を基にして、遺伝子工学的に人為的に改変した蛋白などが含まれる。

また、本発明の「関節疾患アグリカナーゼ」をコードする遺伝子は、上記の「関節疾患アグリカナーゼ」をコードする遺伝子、即ち、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の第 213 番から第 583 番のアミノ酸配列を含むアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物をコードする遺伝子ならいずれでもよい。

また、本発明の「関節疾患アグリカナーゼ」をコードする遺伝子は、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の第 1 番から第 583 番のアミノ酸配列を含むアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物をコードする遺伝子ならいずれでもよい。

さらに、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の第 1 番から第 687 番のアミノ酸配列、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の第 1 番から第 583 番のアミノ酸配列、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の第 213 番から第 950 番のアミノ酸配列、配列番号 1 で表されるアミノ酸配

列の第 213 番から第 687 番のアミノ酸配列、若しくは、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の第 213 番から第 583 番のアミノ酸配列を有するを含むアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物をコードする遺伝子ならいざれでもよい。

ここで、「金属プロテアーゼの同効物をコードする遺伝子」とは、（1）配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の第 213 番から第 583 番のアミノ酸配列を含むアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼの同効物をコードする遺伝子の場合、第 213 番から第 583 番のアミノ酸配列の中のいずれかの 1 乃至複数個（好ましくは 1 ～ 10 個、より好ましくは 1 ～ 5 個）の部位において、1 乃至複数個（好ましくは 1 ～ 10 個、より好ましくは 1 ～ 5 個）のアミノ酸残基が置換、欠失、及び／または挿入されていてかつ、アグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼをコードする遺伝子、（2）配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の第 1 番から第 583 番のアミノ酸配列を含むアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼの同効物をコードする遺伝子の場合、第 1 番から第 583 番のアミノ酸配列の中のいずれかの 1 乃至複数個（好ましくは 1 ～ 10 個、より好ましくは 1 ～ 5 個）の部位において、1 乃至複数個（好ましくは 1 ～ 10 個、より好ましくは 1 ～ 5 個）のアミノ酸残基が置換、欠失、及び／または挿入されていてかつ、アグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼをコードする遺伝子、（3）配列番号 1 で表されるアミノ酸配列、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の第 1 番から第 687 番のアミノ酸配列、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の第 213 番から第 583 番のアミノ酸配列、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の第 213 番から第 950 番のアミノ酸配列、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の第 213 番から第 687 番のアミノ酸配列、若しくは、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の第 213 番から第 583 番のアミノ酸配列を有する金属プロテアーゼの同効物をコードする遺伝子の場合、それぞれの配列の中のいずれかの 1 乃至複数個（好ましくは 1 ～ 10 個、より好ましくは 1 ～ 5 個）の部位におい

て、1乃至複数個（好ましくは1～10個、より好ましくは1～5個）のアミノ酸残基が置換、欠失、及び／または挿入されていてかつ、アグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼをコードする遺伝子、である。

本発明の「関節疾患アグリカナーゼ」をコードする遺伝子として好ましくは、配列番号2記載の塩基配列の1番から1749番、1番から2061番、1番から2850番、637番から1749番、637番から2061番、若しくは637番から2850番を有する遺伝子であり、特に好ましくは配列番号2記載の塩基配列の637番から1749番、637番から2061番、637番から2850番を有する遺伝子である。

本発明のプロモーター遺伝子は、好ましくは、配列番号24、25、26、27、28、29、30若しくは31記載の塩基配列を有する遺伝子である。「配列番号24、25、26、27、28、29、30若しくは31記載の塩基配列の中のいずれかの1乃至複数個（好ましくは1～10個、より好ましくは1～5個）の部位において、1乃至複数個（好ましくは1～10個、より好ましくは1～5個）の塩基が置換、欠失、及び／又は挿入されていて、かつ、「関節疾患アグリカナーゼ」プロモーター活性を有する遺伝子である。「プロモーター活性」とはDNA鎖の情報をRNA鎖に転写するための開始部位として働く活性を意味する。

GENBANK及びSwissProtのBLAST (Basic local alignment search tool) (S. F. Altschul et al., (1990) J. Mol. Biol., 215, 403-410)検索結果によれば、本発明の「関節疾患アグリカナーゼ」の1つであるMDTS6のアミノ酸配列（配列番号1）（950アミノ酸）、及び、当該アミノ酸配列をコードする塩基配列（配列番号2）（2853塩基対）は新規である。前述のADAMTS4、ADAMTS11とアミノ酸配列でのホモロジー検索を行ったところ、配列同一性は50%以下であった。

また、本発明の「関節疾患アグリカナーゼ」には、配列番号1で表されるアミノ酸配列を有する金属プロテアーゼと相同性の高い、アグリカナーゼ活性を

有する金属プロテアーゼが含まれる。相同性の高い、アグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼとは、配列番号1で表されるアミノ酸配列と少なくとも70%以上の配列同一性を示すアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、更に好ましくは95%以上、特に好ましくは99%以上の配列同一性を示すアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼである。相同性は前述のBLAST検索アルゴリズムを用いて特定することができる。

さらに、本発明の「関節疾患アグリカナーゼ」は、関節疾患の原因となるアグリカナーゼ活性を阻害する物質のスクリーニングに使用することができる。該アグリカナーゼ活性を阻害する物質は、プロテオグリカン分解抑制用組成物として有用である。

加えて、本発明の「関節疾患アグリカナーゼ」のプロモーター遺伝子はプロモーター活性を阻害する物質のスクリーニングに使用することができる点が注目される。本明細書において「プロモーター活性を阻害する物質」とは、プロモーターとしての働きを抑え、「関節疾患アグリカナーゼ」の発現を抑制する物質を意味する。本発明には該アグリカナーゼのプロモーター遺伝子を用いたプロモーター活性を阻害する物質をスクリーニングする方法、及び当該プロモーター活性を阻害する物質の関節疾患予防及びまたは治療のための使用が含まれる。さらには、「関節疾患アグリカナーゼ」のプロモーター遺伝子には複数の変異体、すなわち遺伝子多型が存在する。したがって、該遺伝子多型と関節疾患を含む該アグリカナーゼの関与が想定される疾患との相関解析に用いられ、結果として、遺伝子診断のマーカーとして用いられる可能性がある。

ここで、本発明の「関節疾患アグリカナーゼ」をコードする遺伝子、本発明のベクター、本発明の宿主細胞、本発明の「関節疾患アグリカナーゼ」の製造方法、本発明の「関節疾患アグリカナーゼ」のアグリカナーゼ活性を検出する方法、本発明の「関節疾患アグリカナーゼ」に反応する抗体の製造方法、本発

明の「関節疾患アグリカナーゼ」のアグリカナーゼ活性を阻害する物質のスクリーニング方法、プロモーター活性を検出する方法、プロモーター活性を修飾する物質のスクリーニング方法を以下の 1) ~ 7) に記載する。本発明には 1) ~ 7) に記載する事項全てを包含する。以下、1) ~ 7) では「関節疾患アグリカナーゼ」を「蛋白」として説明する。

### 1) 蛋白遺伝子の製造方法

#### a) 第 1 製造法－PCR を用いた方法

本発明の新規蛋白を产生する能力を有するヒト細胞あるいは組織から mRNA を抽出する。次いでこの mRNA を鋳型として該新規蛋白 mRNA または一部の mRNA 領域をはさんだ 2 種類のプライマーを作製する。denature 温度、変性剤添加条件などを改良し、本発明の配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の一部を含む蛋白のそれぞれに適した逆転写酵素－ポリメラーゼ連鎖反応（以下 RT-PCR という）を行うことにより、該新規蛋白の全長 cDNA またはその一部を得ることができる。もしくは、本発明の新規蛋白を产生する能力を有するヒト細胞あるいは組織から調製した mRNA から逆転写酵素により作製した cDNA あるいは市販の該ヒト細胞あるいは組織由来の cDNA を鋳型とした、ポリメラーゼ連鎖反応（以下、PCR という）を行うことにより、該新規蛋白の全長 cDNA またはその一部を得ることができる。さらに、得られた新規蛋白の全長 cDNA またはその一部を適當な発現ベクターに組み込むことにより、宿主細胞で発現させ、該新規蛋白を製造することができる。

まず、本発明の新規蛋白の產生能力を有する細胞あるいは組織から該プロテアーゼをコードするものを包含する mRNA を既知の方法により抽出する。抽出法としては、グアニジン・チオシアネート・ホット・フェノール法、グアニジン・チオシアネート－グアニジン・塩酸法等が挙げられるが、好ましくはグアニジン・チオシアネート塩化セシウム法が挙げられる。該プロテアーゼの產生能力を有する細胞あるいは組織は、該プロテアーゼをコードする塩基配列を有する

遺伝子あるいはその一部を用いたノーザンプロッティング法、該プロテアーゼに特異的な抗体を用いたウエスタンプロッティング法などにより特定することができる。

mRNA の精製は常法に従えばよく、例えば mRNA をオリゴ (dT) セルロースカラムに吸着・溶出させ、精製することができる。さらに、ショ糖密度勾配遠心法等により mRNA をさらに分画することもできる。また、mRNA を抽出せずとも、市販されている抽出精製済みの mRNA を用いても良い。

次に、精製された mRNA をランダムプライマー、オリゴ dT プライマーまたはカスタム合成したプライマーの存在下で、逆転写酵素反応を行い第 1 鎖 cDNA を合成する。この合成は常法によって行うことができる。得られた第 1 鎖 cDNA を用い、目的遺伝子の一部の領域をはさんだ 2 種類のプライマーを用いて PCR に供し、目的とする新規蛋白 DNA を増幅する。また、cDNA を合成せずとも、市販の cDNA を用いてもよい。得られた DNA をアガロースゲル電気泳動等により分画する。所望により、上記 DNA を制限酵素等で切断し、接続することによって目的とする DNA 断片を得ることもできる。

#### b) 第 2 製造法

本発明の遺伝子は上述の製造法の他、常法の遺伝子工学的手法を用いて製造することもできる。まず、前述の方法で得た mRNA を鋳型として逆転写酵素を用いて 1 本鎖 cDNA を合成した後、この 1 本鎖 cDNA から 2 本鎖 cDNA を合成する。その方法としては S 1 ヌクレアーゼ法 (Efstratiadis, A. et al., Cell, 7, 279-288, 1976)、Land 法 (Land, H. et al., Nucleic Acids Res., 9, 2251-2266, 1981)、O. Joon Yoo 法 (Yoo, O. J. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 1049-1053, 1982)、Okayama-Berg 法 (Okayama, H. and Berg, P., Mol. Cell. Biol., 2, 161-170, 1982) などが挙げられる。

次に、上述の方法で得られる組換えプラスミドを大腸菌、例えば DH5  $\alpha$  株、HB101 株、JM109 株等に導入して形質転換させて、テトラサイクリン、アンピシ

リン、カナマイシン等に対する薬剤耐性を指標として組換体を選択することができる。宿主細胞の形質転換は、例えば、宿主細胞が大腸菌の場合には Hanahan の方法(Hanahan, D. J., Mol. Biol., 166, 557-580, 1983)、すなわち  $\text{CaCl}_2$  や  $\text{MgCl}_2$  または  $\text{RbCl}$  を共存させて調製したコンピテント細胞に該組換え DNA 体を加える方法により実施することができる。もちろん、市販のコンピテント細胞を使用しても構わない。なお、ベクターとしてはプラスミド以外にもラムダ系などのファージベクターも用いることができる。

上記により得られる形質転換株から、目的の新規蛋白の DNA を有する株を選択する方法としては、例えば以下に示す各種方法を採用できる。

①合成オリゴヌクレオチドプローブを用いるスクリーニング法

本発明の新規蛋白の全部または一部に対応するオリゴヌクレオチドを合成し（この場合コドン使用頻度を用いて導いたヌクレオチド配列または考えられるヌクレオチド配列を組合せた複数個のヌクレオチド配列のどちらでもよく、また後者の場合、イノシンを含ませてその種類を減らすこともできる）、これをプローブ（ $^{32}\text{P}$  又は  $^{33}\text{P}$  で標識する）として、形質転換株の DNA を変性固定したニトロセルロースフィルターやナイロンフィルターとハイブリダイズさせ、得られた陽性株を検索して、これを選択する。

②ポリメラーゼ連鎖反応により作製したプローブを用いるスクリーニング法

本発明の新規蛋白の一部に対応するセンスプライマーとアンチセンスプライマーのオリゴヌクレオチドを合成し、これらを組合せてポリメラーゼ連鎖反応 (Saiki, R. K. et al., Science 239, 487-491, 1988) を行い、目的の新規蛋白の全部又は一部をコードする DNA 断片を増幅する。ここで用いる鑄型 DNA としては、該新規蛋白を產生する細胞の mRNA より逆転写反応にて合成した cDNA、またはゲノム DNA を用いることができる。このようにして調製した DNA を断片を  $^{32}\text{P}$  又は  $^{33}\text{P}$  で標識し、これをプローブとして用いてコロニーハイブリダイゼ

ーションまたはマークハイブリダイゼーションを行うことにより目的のクローンを選択する。

③他の動物細胞で新規蛋白を産生させてスクリーニングする方法

形質転換株を培養し、遺伝子を増幅させ、その遺伝子を動物細胞にトランスフェクトし（この場合、自己複製可能で転写プロモーター領域を含むプラスミドもしくは動物細胞の染色体に組み込まれ得るようなプラスミドのいずれでもよい）、遺伝子にコードされた蛋白を細胞外に産生させる。本発明の新規蛋白に対する抗体を用いて該新規蛋白を検出することにより、元の形質転換株より目的の新規蛋白をコードする cDNA を有する株を選択する。

④本発明の新規蛋白に対する抗体を用いて選択する方法

あらかじめ、cDNA を発現ベクターに組込み、形質転換株の培養上清、細胞内もしくは細胞表面に蛋白を産生させ、本発明の新規蛋白に対する抗体および該抗体に対する 2 次抗体を用いて、所望の新規蛋白産生株を検出し、目的の株を選択する。

⑤セレクティブ・ハイブリダイゼーション・トランスレーションの系を用いる方法

形質転換株から得られる cDNA を、ニトロセルロースフィルター等にプロットし、本発明の新規蛋白産生細胞からの mRNA をハイブリダイズさせた後、cDNA に結合した mRNA を解離させ、回収する。回収された mRNA を蛋白翻訳系、例えばアフリカツメガエルの卵母細胞への注入や、ウサギ網状赤血球ライゼートや小麦胚芽等の無細胞系で蛋白に翻訳させる。本発明の新規蛋白に対する抗体を用いて検出して、目的の株を選択する。

得られた目的の形質転換株より本発明の新規蛋白をコードする DNA を採取する方法は、公知の方法(Sambrook, J. et al., "Molecular Cloning-A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1989) 等の遺伝子操作実験マ

-15-

ニュアルに従い実施できる。例えば細胞よりプラスミドDNAに相当する画分を分離し、該プラスミドDNAよりcDNA領域を切り出すことにより行ない得る。

c) 第3製造法

本発明の新規蛋白遺伝子は、化学合成法によって製造したDNA断片を結合することによっても製造できる。各DNAは、DNA合成機〔例えば、Oligo 1000M DNA Synthesizer (Beckman社製)、あるいは、394 DNA/RNA Synthesizer (Applied Biosystems社製)など〕を用いて合成することができる。

d) 第4製造法

本発明の新規蛋白遺伝子は、新規蛋白の情報に基づいて、例えばホスファイト・トリエステル法(Hunkapiller, M. et al., *Nature*, 10, 105-111, 1984)等の常法に従い、核酸の化学合成により製造することもできる。なお、所望アミノ酸に対するコドンはそれ自体公知であり、その選択も任意でよく、例えば利用する宿主のコドン使用頻度を考慮して常法に従い決定できる(Crantham, R. et al., *Nucleic Acids Res.*, 9, r43-r74, 1981)。さらに、これら塩基配列のコドンの一部改変は、常法に従い、所望の改変をコードする合成オリゴヌクレオチドからなるプライマーを利用したサイトスペシフィック・ミュータジェネシス(site specific mutagenesis) (Mark, D. F. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 5662-5666, 1984)等に従うことができる。

以上、a) 乃至d) により得られるDNAの配列決定は、例えばマキサム-ギルバートの化学修飾法(Maxam, A. M. and Gilbert, W., "Methods in Enzymology", 65, 499-559, 1980)やジデオキシヌクレオチド鎖終結法(Messing, J. and Vieira, J., *Gene*, 19, 269-276, 1982)等により行うことができる。

2) 本発明のベクター、本発明の宿主細胞、本発明の組み換え蛋白の製造方法

単離された本発明の新規蛋白をコードする遺伝子を含む断片は、適当なベクターDNAに再び組込むことにより、真核生物および原核生物の宿主細胞を形質

転換させることができる。さらに、これらのベクターに適当なプロモーターおよび形質発現にかかる配列を導入することにより、それぞれの宿主細胞において遺伝子を発現させることが可能である。

例えば、真核生物の宿主細胞には、脊椎動物、昆虫、酵母等の細胞が含まれ、脊椎動物細胞としては、サルの細胞である COS 細胞 (Gluzman, Y. Cell, 23, 175-182, 1981) やチャイニーズ・ハムスター卵巣細胞 (CHO) のジヒドロ葉酸レダクターゼ欠損株 (Urlaub, G. and Chasin, L. A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4216-4220, 1980)、ヒト胎児腎臓由来 HEK293 細胞および同細胞に Epstein Barr Virus の EBNA-1 遺伝子を導入した 293-EBNA 細胞 (Invitrogen 社製) 等がよく用いられるが、これらに限定されるわけではない。

脊椎動物細胞の発現ベクターとしては、通常発現しようとする遺伝子の上流に位置するプロモーター、RNA のスプライス部位、ポリアデニル化部位および転写終結配列等を有するものを使用でき、これはさらに必要により複製起点を有してもよい。該発現ベクターの例としては、SV40 の初期プロモーターを有する pSV2dhfr (Subramani, S., et al. Mol. Cell. Biol., 1, 854-864, 1981)、ヒトの elongation factor プロモーターを有する pEF-BOS (Mizushima, S. and Nagata, S., Nucleic Acids Res., 18, 5322, 1990)、cytomegalovirus プロモーターを有する pCEP4 (Invitrogen 社製) 等を例示できるが、これらに限定されない。

宿主細胞として、COS 細胞を用いる場合を例に挙げると、発現ベクターとしては、SV40 複製起点を有し、COS 細胞において自律増殖が可能であり、さらに転写プロモーター、転写終結シグナルおよび RNA スプライス部位を備えたものを用いることができ、例えば、pME18S (Maruyama, K. and Takebe, Y., Med. Immunol., 20, 27-32, 1990)、pEF-BOS (Mizushima, S. and Nagata, S., Nucleic Acids Res., 18, 5322, 1990)、pCDM8 (Seed, B., Nature, 329, 840-842, 1987) 等が挙げられる。該発現ベクターは DEAE-デキストラン法 (Luthman, H. and

Magnusson, G., Nucleic Acids Res., 11, 1295-1308, 1983)、リン酸カルシウム-DNA共沈殿法(Graham, F. L. and van der Ed, A. J., Virology, 52, 456-457, 1973)、FuGENE<sup>TM</sup>6 Transfection Reagent(Boeringer Mannheim 社製)を用いた方法、および電気パルス穿孔法(Neumann, E. et al., EMBO J., 1, 841-845, 1982)等により COS 細胞に取り込ませることができ、かくして所望の形質転換細胞を得ることができる。

また、宿主細胞として CHO 細胞を用いる場合には、発現ベクターと共に、G418 耐性マーカーとして機能する neo 遺伝子を発現し得るベクター、例えば pRSVneo(Sambrook, J. et al., "Molecular Cloning-A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1989) や pSV2-neo(Southern, P. J. and Berg, P., J., Mol. Appl. Genet., 1, 327-341, 1982) 等をコ・トランスフェクトし、G418 耐性のコロニーを選択することにより新規蛋白を安定に産生する形質転換細胞を得ることができる。また、宿主細胞として 293-EBNA 細胞を用いる場合には、Epstein Barr Virus の複製起点を有し、293-EBNA 細胞で自己増殖が可能な pCEP4(Invitrogen 社製)などの発現ベクターを用いて所望の形質転換細胞を得ることができる。

上記で得られる所望の形質転換細胞は、常法に従い培養することができ、該培養により細胞外に本発明の新規蛋白が生産される。該培養に用いられる培地としては、採用した宿主細胞に応じて慣用される各種のものを適宜選択でき、例えば上記 COS 細胞であれば RPMI-1640 培地やダルベッコ修飾イーグル最小必須培地(DMEM)等の培地に必要に応じ牛胎児血清(FBS)等の血清成分を添加したものを使用できる。また、上記 293-EBNA 細胞であれば牛胎児血清(FBS)等の血清成分を添加したダルベッコ修飾イーグル最小必須培地(DMEM)等の培地に G418 を加えたものを使用できる。

上記により、形質転換細胞の細胞外に生産される本発明の新規蛋白は、該新規蛋白の物理的性質や生化学的性質等を利用した各種の公知の分離操作法によ

り、分離・精製することができる。該方法としては、具体的には例えば該新規蛋白を含む培養液を通常の蛋白沈殿剤による処理、限外濾過、分子ふるいクロマトグラフィー（ゲル濾過）、吸着クロマトグラフィー、イオン交換体クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）等の各種液体クロマトグラフィー、透析法、これらの組合せ等を例示できる。

本発明の新規蛋白はマーカー配列とインフレームで融合して発現させることで、該新規蛋白の発現の確認、精製等が可能になる。マーカー配列としては、例えば、FLAG epitope、Hexa-Histidine tag、Hemagglutinin tag、myc epitopeなどがある。また、マーカー配列と該新規蛋白の間にエンテロキナーゼ、ファクターXa、トロンビンなどのプロテアーゼが認識する特異的なアミノ酸配列を挿入することにより、マーカー配列部分をこれらのプロテアーゼにより切断除去する事が可能である。

### 3) 本発明の蛋白のアグリカナーゼ活性を検出する方法

本発明の蛋白のアグリカナーゼ活性は、本発明の関節疾患アグリカナーゼと以下に挙げる基質とを適当な緩衝液中で混合し、反応させた後、それぞれの基質にあった方法で検出することができる。

基質としては、ヒトもしくは他の動物の軟骨・組織より精製したアグリカン、あるいは遺伝子組換えアグリカン、市販のアグリカン（生化学工業製）、もしくはそれらの部分蛋白を用いることができる。これらの基質と被試験プロテアーゼを含む細胞・組織培養液、細胞・組織抽出液もしくは（部分）精製標品を反応させ、Glu<sup>373</sup>-Ala<sup>374</sup>の間で切断された断片を検出することによりアグリカナーゼ活性を測定することができる。Glu<sup>373</sup>-Ala<sup>374</sup>の間で切断された断片の検出には、常法に従い分解断片のN末端配列もしくはC末端配列を決定する手法や、より簡便にGlu<sup>373</sup>-Ala<sup>374</sup>の間で切断されることにより生じるC末端のNITGE<sup>373</sup>、N末端の374ARGSVを特異的に認識する抗ネオエピトープ抗体

(Hughes C. E. et al., Biochem J., 305, 799-804, 1995) を用いた ELISA (Enzyme Linked Immuno Solvent Assay) やウエスタンプロティング等の免疫学的手法を用いることができる。好ましくは、実施例 7 および 9 記載の方法で実施することができる。

#### 4) 本発明の新規蛋白に反応する抗体の作製方法

本発明の新規蛋白に反応する抗体、例えばポリクローナル抗体、モノクローナル抗体は、各種動物に該新規蛋白や該新規蛋白の断片を直接投与することで得ることができる。また、本発明新規蛋白をコードする遺伝子を導入したプラスミドを用いて DNA ワクチン法 (Raz, E. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 9519-9523, 1994; Donnelly, J. J. et al., J. Infect. Dis., 173, 314-320, 1996) によっても得ることができる。

ポリクローナル抗体は該新規蛋白またはその断片をフロイント完全アジュバントなどの適当なアジュバントに乳濁し、腹腔、皮下または静脈等に免疫して感作した動物、例えばウサギ、ラット、ヤギ、またはニワトリ等の血清または卵から製造される。このように製造されたポリクローナル抗体は常法の蛋白質単離精製法により、分離精製することができ、常法の蛋白質単離精製法としては例えば、遠心分離、透析、硫酸アンモニウムによる塩析、DEAE-セルロース、ハイドロキシアパタイト、プロテイン A アガロース等によるクロマトグラフィー法が挙げられる。

モノクローナル抗体は、ケーラーとミルスタインの細胞融合法 (Kohler, G. and Milstein, C., Nature, 256, 495-497, 1975) により当業者が容易に製造することが可能である。

すなわち、本発明新規蛋白またはその断片をフロイント完全アジュバントなどの適当なアジュバントに乳濁した乳濁液を数週間おきにマウスの腹腔、皮下または静脈に数回繰り返し接種することにより免疫する。最終免疫後、脾臓細胞を取り出し、ミエローマ細胞と融合してハイブリドーマを作製する。

-20-

ハイブリドーマを得るためのミエローマ細胞としては、ヒポキサンチングアニンホスホリポシルトランスフェラーゼ欠損やチミジンキナーゼ欠損のようなマーカーを持つミエローマ細胞、例えば、マウスミエローマ細胞株 P3X63Ag8. U1、を利用する。また、融合剤としてはポリエチレングリーコールを利用する。さらにはハイブリドーマ作製における培地として、イーグル最小必須培地、ダルベッコ修飾最小必須培地、RPMI-1640などの通常よく用いられているものに適宜 10~30%の牛胎児血清を加えて用いる。融合株は HAT 選択法により選択する。ハイブリドーマのスクリーニングは培養上清を用い、ELISA 法、免疫組織染色法などの周知の方法または前記のスクリーニング法により行い、目的の抗体を分泌しているハイブリドーマのクローンを選択する。また、限界希釈法によって、サブクローニングを繰り返すことによりハイブリドーマの単クローン性を保証する。このようにして得られるハイブリドーマは培地中で数日間、あるいはプリスタンで前処理した BALB/c 系マウスの腹腔内で 10~20 日培養することで精製可能な量の抗体が產生される。このように製造されたモノクローナル抗体は培養上清あるいは腹水から常法の蛋白質単離精製法により分離精製することができる。

以上のように分離精製された抗体につき、常法により、ペプシン、パパイン等の蛋白質分解酵素によって消化を行い、引き続き常法の蛋白質単離精製法により分離精製することで、活性のある抗体の一部分を含む抗体断片、例えば、 $F(ab')_2$ 、Fab、Fab'、Fv を得ることができる。

さらには、本発明新規蛋白に反応する抗体を、クラクソンらやゼベデーの方法 (Clackson, T. et al., Nature, 352, 624-628, 1991; Zebedee, S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 3175-3179, 1992) により single chain Fv や Fab として得ることも可能である。また、マウスの抗体遺伝子をヒト抗体遺伝子に置き換えたトランスジェニックマウス (Lonberg, N. et al., Nature, 368, 856-859, 1994) に免疫することでヒト抗体を得ることも可能である。

5) 本発明の「関節疾患アグリカナーゼ」のアグリカナーゼ活性を阻害する物質のスクリーニング方法

3) に示したアグリカナーゼ活性の検出法と同様の方法でスクリーニングが可能である。また、本発明の新規蛋白と反応させることにより分解され消滅・減少する添加したアグリカン、組換えアグリカン、市販のアグリカン、もしくはそれらの部分蛋白量を、アグリカナーゼで切断される部位の N 側および C 側部分のポリペプチドを特異的に認識する抗体を用いて計測する実施例 10-2 に例示するような ELISA などの方法を用いることができる。さらには、本発明の新規蛋白と実施例 7-1 に例示するような N 末に FLAG タグ、C 末に His タグが付加した組換えアグリカンを反応させて分解され消滅・減少する添加した組換えアグリカン量を抗 FLAG タグ、抗 HIS タグ抗体を用いた ELISA 等で計測する方法が用いられる。この場合のタグは FLAG タグおよび His タグに限定されず、また、組換えアグリカンは実施例 7-1 に限定されず、本蛋白によりアグリカナーゼ切断部位で切断されるアグリカンの部分蛋白もしくは改変蛋白であればよい。アグリカナーゼ活性に用いる被験物質は、被験物質としては従来金属プロテアーゼ阻害活性を有することは知られているが該新規蛋白のアグリカナーゼ活性に対して阻害するかが不明な化合物またはペプチド、あるいは種々の公知化合物やペプチド、コンビナトリアル・ケミストリー技術 (Terrett, N. K. et al., *Tetrahedron*, 51, 8135-8137, 1995) や通常の合成技術を用いて合成された化合物群やファージ・ディスプレイ法 (Felici, F. et al., *J. Mol. Biol.*, 222, 301-310, 1991) などを応用して作製されたランダム・ペプチド群を用いることができる。また、微生物の抽出物や培養上清、植物、海洋生物由来の天然成分、動物組織抽出物などもスクリーニングの対象となる。あるいは本発明のスクリーニング法により選択された化合物またはペプチドを化学的または生物学的に構造修飾した化合物またはペプチドを用いる。

本発明の新規蛋白のアグリカナーゼ活性を阻害する物質（化合物、ペプチド、抗体及び抗体断片）のスクリーニングには、本発明の新規蛋白またはその部分ペプチドの基質となるものであればいずれのものでも使用可能であり、好ましくは前記3)に記載の基質である。

#### 6) プロテオグリカンの分解・遊離検出方法

軟骨プロテオグリカンの分解・遊離の検出、計測には、実施例11-2に例示される<sup>35</sup>SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>をトレーサーとして用いる方法、プロテオグリカン抗体を用いる方法、ゲルろ過により分解断片を検出する方法 (Methods in Cartilage Research, Academic Press Limited. 1990; Joint Cartilage Degradation, Marcel Dekker, Inc., 1993) や、1,9-dimethylmethylen blue (DMMB)を用いた比色法 (Goldberg R. L. and Kolibas L. M., Connect. Tissue Res., 24, 265-275, 1990) などが用いられるが、これらに限定されない。

#### 7) 本発明のプロモーター活性を阻害する物質のスクリーニングの方法

本発明のプロモーター活性を阻害する物質をスクリーニングする際、そのプロモーター活性を検出する方法としては、実施例13に示した配列（配列番号24乃至31）およびその部分配列が有するレポーター遺伝子プラスミドを用いる方法が簡便である。レポーター遺伝子とは通常の手段（例えば、酵素活性の測定等、当業者に既知の定量法）によって定量することができる蛋白をコードする遺伝子を指し、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、ルシフェラーゼ、β-ガラクトシダーゼ、アルカリリフォスファターゼ遺伝子がよく用いられているがこれらに限定されない。レポーター遺伝子プラスミドを構築する基となるベクターに関しては制限はなく、市販のプラスミドベクター、例えば、pGV-B2（東洋インキ社製）やpSEAP2-Basic（Clontech社製）などを用いることができる。これらのベクターのレポーター遺伝子の上流に当該配列を順方向に挿入したレポーター遺伝子プラスミドを構築し、このプラスミドで形質転換した細胞において発現されるレポーター蛋白の量をそれぞれに適した方法で測定

することにより当該配列のプロモーター活性の有無、強度を知ることができ、また、上記形質転換細胞の培養液に被験物質を添加することにより、被験物質の当該プロモーター活性に及ぼす作用を検出することができる。

本発明の配列番号の配列およびその部分配列の有するプロモーター活性を阻害する物質（化合物、ペプチド、抗体及び抗体断片）のスクリーニングには、上記のプロモーター活性を検出する方法と同様の方法を用いることができる。被験物質としては従来プロモーター活性を阻害することは知られているが配列番号 24 乃至 31 の配列およびその部分配列の有するプロモーター活性を阻害するかが不明な化合物またはペプチド、あるいは種々の公知化合物やペプチド、コンビナトリアル・ケミストリー技術（Terrett, N. K. et al., *Tetrahedron*, 51, 8135-8137, 1995）や通常の合成技術を用いて合成された化合物群やファージ・ディスプレイ法（Felici, F. et al., *J. Mol. Biol.*, 222, 301-310, 1991）などを応用して作製されたランダム・ペプチド群、抗体及び抗体断片を用いることができる。また、微生物の抽出物や培養上清、植物、海洋生物由来の天然成分、動物組織抽出物などもスクリーニングの対象となる。あるいは本発明のスクリーニング法により選択された化合物またはペプチドを化学的または生物学的に構造修飾した化合物またはペプチドを用い得る。

本発明には、前記スクリーニング法により選択される「関節疾患アグリカナーゼ」のアグリカナーゼ活性を有意に阻害する物質（化合物、ペプチド、抗体及び抗体断片）を有効成分とする医薬が含まれ、特に医薬として好ましくはプロテオグリカン分解抑制用医薬組成物である。「関節疾患アグリカナーゼ」の活性を有意に阻害する物質としては、実施例 10-2 で示されるスクリーニング系で選択された、 $N^{\alpha}-[2-(1-\text{ヒドロキシカルバモイル}-2-\text{スルファニルエチル})-4-\text{メチルペンタノイル}]-N, \text{O}-\text{ジメチルチロシンアミド}$ （以下、化合物Aとする）、 $N^{\alpha}-[2-(1-\text{ヒドロキシカルバモイル}-2-$

-24-

ースルファニルエチル) - 4 - メチルペントノイル] - N - メチルフェニルアラニンアミド (以下、化合物Bとする) 、 N<sup>α</sup> - [2 - (1 - ヒドロキシカルバモイル - 2 - フェニルスルファニルエチル) - 4 - メチルペントノイル] - N, O - ジメチルチロシンアミド (以下、化合物Cとする) 、 N<sup>α</sup> - [2 - (1 - ヒドロキシカルバモイル - 2 - メチルスルファニルエチル) - 4 - メチルペントノイル] - N, O - ジメチルチロシンアミド (以下、化合物Dとする) などが挙げられる。上記化合物A、化合物B、化合物C及び化合物Dは、W090/05719の請求の範囲に含まれる化合物であるが、本発明はそれらの化合物を有効成分とする医薬に限らず、「関節疾患アグリカナーゼ」のアグリカナーゼ活性を有意に阻害する物質を有効成分とする医薬であれば全て包含される。尚、上記化合物A、化合物B、化合物C及び化合物Dは W090/05719 に収載された製造方法に準じて W090/05719 に収載された化合物と同様に合成することができる。

本発明の「関節疾患アグリカナーゼ」のアグリカナーゼ活性を有意に阻害する物質 (化合物、ペプチド、抗体または抗体断片) を有効成分とする製剤は、該有効成分のタイプに応じて、それらの製剤化に通常用いられる担体や賦形剤、その他の添加剤を用いて調製されうる。

投与は錠剤、丸剤、カプセル剤、顆粒剤、細粒剤、散剤、経口用液剤などによる経口投与、あるいは静注、筋注、関節注などの注射剤、坐剤、経皮投与剤、経粘膜投与剤などによる非経口投与が挙げられる。特に胃で消化されるペプチドにあっては静注等の非経口投与が望まれる。

本発明による経口投与のための固体組成物は、一つ又はそれ以上の活性物質が少なくとも一つの不活性な希釈剤、例えば乳糖、マンニトール、ブドウ糖、微結晶セルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、デンプン、ポリビニルピロリドン、メタケイ酸アルミン酸マグネシウムなどと混合される。組成物は常法に従って、不活性な希釈剤以外の添加剤、例えば滑沢剤、崩壊剤、安定化剤、

溶解乃至溶解補助剤などを含有していてもよい。錠剤や丸剤は必要により糖衣又は胃溶性若しくは腸溶性物質などのフィルムで被覆していてもよい。

経口のための液体組成物は、乳濁剤、溶液剤、懸濁剤、シロップ剤、エリキシル剤を含み、一般的に用いられる不活性な希釈剤、例えば精製水、エタノールを含む。該組成物は不活性な希釈剤以外の添加剤、例えば湿潤剤、懸濁剤、甘味剤、芳香剤、防腐剤を含有していてもよい。

非経口のための注射剤としては、無菌の水性または非水性の溶液剤、懸濁剤、乳濁剤を含む。水溶性の溶液剤や懸濁剤には、希釈剤として例えば注射用蒸留水、生理用食塩水などが含まれる。非水溶性の溶液剤、懸濁剤の希釈剤としてはプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油のような植物油、エタノールのようなアルコール類、ポリソルベート 80 等を含む。該組成物はさらに湿潤剤、乳化剤、分散剤、安定化剤、溶解乃至溶解補助剤、防腐剤などを含んでいてもよい。組成物は例えばバクテリア保留フィルターを通す濾過、殺菌剤の配合、または照射によって無菌化される。また、無菌の固体組成物を製造し、使用に際し無菌水その他の無菌用注射用媒体に溶解し使用することもできる。

投与量は前記スクリーニング法により選択された有効成分の活性の強さ、症状、投与対象の年齢、性別等を考慮して適宜決定される。

例えば、経口投与の場合、その投与量は、通常、成人（体重 60 kg として）において、1 日につき約 0.1～1000 mg、好ましくは 0.1～100 mg である。非経口投与の場合、注射剤の形では 1 日につき約 0.01～1000 mg、好ましくは 0.01～100 mg である。

#### 図面の簡単な説明

図 1 は実施例 6 で得られた、ECL ウエスタンプロッティング検出システムを用い、MDTS6TSP1 の動物細胞株での発現結果を示す写真である。

図2は実施例7-2で得られた、ECLウエスタンプロッティング検出システムを用い、MDTS6TSP1の組換えアグリカンG1G2分解活性の検出結果を示す写真である。

図3は実施例7-3で得られた、ウエスタンプロッティング検出システムを用い、MDTS6TSP1で分解された組換えアグリカンG1G2の抗アグリカナーゼネオエピトープ抗体による解析結果を示す写真である。

図4は実施例8で得られた、IL-1 $\beta$ によるMDTS6 mRNAの発現誘導を検討した結果を示す電気泳動パターン写真である。

図5は実施例9-2で得られた、MDTS6蛋白による天然型アグリカンの分解をウエスタンプロッティング検出システムを用い、抗アグリカナーゼネオエピトープ抗体で検出した結果を示す写真である。

図6は実施例11-2で得られた、ウサギ膝関節初代培養細胞からのall-transレチノイン酸およびIL-1 $\beta$ によるプロテオグリカンの遊離を検出した結果を示すグラフである。

図7は実施例11-3で得られた、ウサギ膝関節初代培養細胞をall-transレチノイン酸およびIL-1 $\beta$ 処理した場合のMDTS6の遺伝子発現変動をRT-PCR法により解析した結果を示す電気泳動パターン写真である。

図8は実施例12で得られた、all-transレチノイン酸によるウサギ膝関節初代培養細胞からのプロテオグリカンの分解・遊離が化合物Aおよび化合物Bにより抑制されることを示したグラフである。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を更に具体的に説明する。

特に断りのない限り、公知の方法(Sambrook, J. et al., "Molecular Cloning-A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1989)等

の遺伝子操作実験マニュアルに従ったが、本発明は実施例に限定されるものではない。

#### (実施例 1) 新規 ADAMTS 遺伝子 MDTS6 の部分配列の発見

ヒト脳由来 cDNA ライブラリーは文献 (Ohara O. et al., DNA Res., 4, 53-59, 1997) に示すように挿入配列の大きさによって厳密に分画されたものを構築した。これらのサプライブラリーの cDNA 断片のサイズ分布は 3kbp-8kbp である。このライブラリーを構成するクローンの 5'-及び 3'-末端の配列を解読し、自家製の EST データバンクを構築した。この中から、MDTS6 の部分配列を得た。

#### (実施例 2) MDTS6 の全長 ORF 配列の決定

MDTS6 の cDNA クローンの配列を決定することにより、配列番号 2 の 832 番から 2853 番の配列を得た。配列番号 2 の 1 番から 831 番の配列は、Clontech 社製のヒト脳およびヒト胎盤の Marathon-Ready™ cDNA を鋳型、LA-Taq™ (宝酒造社製) を DNA ポリメラーゼとして、RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) を繰り返すことにより取得した。その結果、全長 MDTS6 は、配列番号 1 に示すように 950 アミノ酸からなる新規蛋白であることが判明した。そのドメイン構造は N 末から、分泌シグナル配列、プロ領域、furin プロテアーゼ認識配列、金属プロテアーゼドメイン、ディスインテグリンドメイン、トロンボスポンジン I 型繰り返し配列 (以下、TSP-1 繰り返し配列という) 、Cys 残基に富むドメイン、中間領域、TSP-1 繰り返し配列 2 個であり、ADAMTS ファミリーに属する分子であった (Kuno, K. et al., J. Biol. Chem., 272, 556-562, 1997; Tang, B. L. et al., FEBS Lett., 445, 223-225, 1999)。

#### (実施例 3) C 末 FLAG 付加型発現ベクターの作製

pCEP4 (Invitrogen 社製) を制限酵素 *Cla*I、*Nsi*I で切断し、平滑末端化後、自己連結反応を行い、EBNA1 発現ユニットを除去した発現ベクター pCEP4d を作製した。このベクターを制限酵素 *Nhe*I、*Bam*HI で切断し、アガロースゲル抽出した約 7.7kbp の断片に、配列番号 3 で示される核酸と配列番号 4 で示される核

酸をアニールさせた重鎖オリゴヌクレオチドを挿入して、目的の配列を有するクローンを選択し、pCEP4d-FLAG と命名した。このベクターを鋳型、配列番号 5 で示されるオリゴ DNA、配列番号 6 で示されるオリゴ DNA をプライマーとして、PyroBest™ DNA ポリメラーゼを用いて PCR 反応を行った。生じた約 0.4 kbp の DNA 断片を制限酵素 SpeI で切断し、XbaI で切断した pCEP4d-FLAG (約 7.7 kbp) に挿入し、目的通りプロモーターよりクローニングサイトの XbaI、NheI、NotI、BamHI 認識配列そして FLAG タグという順になっているクローンを選択して、pCEP4dE2-FLAG を完成した。

#### (実施例 4) MDTs6 短長蛋白 (MDTs6TSP1) 発現プラスミドの構築

配列番号 1 の 1 番から 583 番 (MDTs6 の N 末から TSP1 繰り返し配列を含む領域 (以下 MDTs6TSP1 とする) に相当する部分) を C 末に FLAG を付加した蛋白として発現するためのプラスミドは以下の如く構築した。

まず、配列番号 2 の 1 番から 1749 番の遺伝子を PCR により取得した。配列番号 7 と配列番号 8 で示されるオリゴ DNA をプライマー、ヒト胎盤の Marathon-Ready™ cDNA (Clontech 社製) を鋳型、LA-Taq™ (宝酒造社製) を DNA ポリメラーゼとして、94°C 1 分の後、98°C 10 秒、68°C 2 分のサイクルを 10 回行った。この反応液を 50 倍希釈した DNA 溶液を鋳型として、PyroBest™ DNA ポリメラーゼを用い、94°C 2 分の後、98°C 10 秒、66°C 30 秒、74°C 4 分のサイクルを 40 回、続いて 72°C 10 分の条件で PCR を行った。こうして生成した 5' 側に XbaI 認識配列および Kozak 配列を、3' 側に NotI 認識配列が付加された目的断片を PCR-Blunt にサブクローンして配列を確認した後、制限酵素 XbaI、NotI で切断し、pCEP4dE2-FLAG の XbaI、NotI 部位に挿入して、pCEP-MDTs6TSP1-FLAG を完成した。

#### (実施例 5) MDTs6 全長蛋白発現プラスミドの構築

配列番号 1 の 1 番から 950 番を C 末に FLAG を付加した蛋白として発現するためのプラスミドは以下の如く構築した。

まず、配列番号 2 の 1534 番から 2850 番の遺伝子を PCR により取得した。詳しくは、配列番号 9 と配列番号 10 で示されるオリゴ DNA をプライマー、EST クローンのプラスミド DNA を鋳型、PyroBest™ DNA ポリメラーゼを DNA ポリメラーゼとして、94℃1 分の後、98℃10 秒、50℃15 秒、72℃2 分のサイクルを 20 回、続いて 72℃7 分の反応を行った。なお、EST クローンのプラスミド DNA を鋳型とする代わりに、ヒト胎盤の Marathon-Ready™ cDNA (Clontech 社製) を鋳型、配列番号 9 と配列番号 10 で示されるオリゴ DNA をプライマーとして、94℃2 分の後、98℃10 秒、68℃2 分のサイクルを 40 回、続いて 72℃7 分の反応条件で PCR を行うことにより、目的断片を生成することができた。こうして生成した 3' 側に NotI 認識配列が付加された目的断片を PCR-Blunt にサブクローンして配列を確認し、pCRB-MDTS6-3H とした。

配列番号 2 の 1566 番から 1571 番に BamHI 認識配列があることを利用し、pCEP-MDTS6TSP1-FLAG を制限酵素 XbaI、BamHI で切断して生じた約 1.6 kbp の DNA 断片と、pCRB-MDTS6-3H を BamHI、NotI で切断して生じた約 1.3 kbp の DNA 断片を連結し、pCEP4dE2-FLAG の XbaI、NotI 部位に挿入して、pCEP-MDTS6F-FLAG を完成した。

#### (実施例 6) MDTS6TSP1 及び MDTS6 全長蛋白の動物細胞株での発現

実施例 4 において pCEP4dE2-FLAG を骨格として作製した発現プラスミドを FuGENE™6 Transfection Reagent (Boehringer Mannheim 社製) を用いて添付指示書に従い HEK293-EBNA 細胞 (invirogen 社製) に導入した。プラスミド導入後、1-2 日間培養して得た培養上清中に目的蛋白が存在することを、C 末端に付加した FLAG タグに対する抗体 (マウス抗 FLAG モノクローナル抗体 (M2 ; Sigma 社製) を用いたウエスタンプロッティングで確認した。すなわち、上記培養上清を SDS/10%~20% アクリルアミドゲル (第一化学薬品社製) を用いて電気泳動後、プロッティング装置を用いて PVDF 膜に転写した。転写後の PVDF 膜に、ブロックエース (大日本製薬社製) を添加してブロッキングした後、マウス抗

-30-

FLAG モノクローナル抗体 (M2 ; Sigma 社製) 、西洋わさびパーオキシダーゼ標識ウサギ抗マウス IgG ポリクローナル抗体 (Zymed 社製もしくは TAGO 社製) を順次反応させた。または、ブロッキング後、ビオチン化 M2 抗体 (Sigma 社製) 、西洋わさびパーオキシダーゼ標識ストレプトアビシン (Amasham 社製) を順次反応させた。反応後、ECL ウエスタンプロッティング検出システム (アマシャムファルマシア社製) を用いて該蛋白の発現を確認した (図 1)。発現された蛋白の分子量はアミノ酸配列から算出される値よりも約 23K 小さかった。上述の如く HEK293-EBNA 細胞にて発現させた MDTs6TSP1 の N 末端配列は、C 末端に FLAG タグが付加していることを利用して、実施例 7-1 の方法でアフィニティ精製した後、PVDF 膜に転写し、Ponceau S 染色された MDTs6TSP1 の N 末端配列を ABI 社 494 型ペプチドシークエンサーで解析することにより決定した。その結果、配列番号 1 の 213 番目の Phe から始まっており、他の ADAMTS 分子同様に、プロ領域と金属プロテアーゼドメインの間にある furin プロテアーゼ認識配列で切断され成熟蛋白 (配列番号 1 の 213 番から 583 番) になることが示された。また、MDTs6 全長蛋白についても実施例 5 で得られた発現プラスミドを用い、上記 MDTs6TSP1 の蛋白発現と同様に取得し、MDTs6TSP1 と同様に、プロ領域と金属プロテアーゼドメインの間にある furin プロテアーゼ認識配列で切断され成熟蛋白 (配列番号 1 の 213 番から 950 番) になることを確認した。

(実施例 7) 動物細胞を宿主に発現した MDTs6TSP1 蛋白の酵素活性の検出

(実施例 7-1) 組換えアグリカン G1G2 の調製

報告されているヒトアグリカンの遺伝子配列 (Doege K, et al. Biochem Soc Trans., 18, 200-202, 1990) をもとに合成した配列番号 11 と配列番号 12 で示されるオリゴ DNA をプライマー、ヒト胎盤の Marathon-Ready™ cDNA を鋳型、PyroBest™ DNA ポリメラーゼを DNA ポリメラーゼとして、94°C 1 分の後、98°C 10 秒、68°C 2 分のサイクルを 40 回、続いて 68°C 7 分の反応を行った。生成した DNA 断片を制限酵素 BamHI で切断し、pCEP-SigFla の BamHI 部位に導入し、ヒト

アグリカンの球状ドメイン1 (G1) -球状ドメイン2 (G2) の N 末に FLAG タグ、 C 末に His タグの付加した蛋白を発現するために用いる発現プラスミド pCEP-rAgg を作製した。 pCEP-SigFla は pCEP4d の HindIII、 XhoI 部位に配列番号 13 と配列番号 14 で示されるオリゴ DNA の二重鎖を導入したものであり、プロモーターの下流に、文献 (Guan X-M. et al., J. Biol. Chem. 267, 21995-21998, 1992) に示されたインフルエンザウィルスの hemagglutinin 由来の分泌シグナル配列と FLAG タグ配列、続いて、 BamHI 認識配列を有する発現ベクターである。

pCEP-rAgg を HEK293-EBNA 細胞に導入し、3-7 日培養して目的蛋白を発現、生産した。培養液上清からの目的蛋白の精製は、N 末端に FLAG タグが付加していることをを利用して、アフィニティ精製した。すなわち、培養上清をカラムに詰めた M2-agarose (Sigma 社製) にアプライし、20 mM Tris-HCl (pH 7.4) / 150 mM NaCl (以下、TBS という) で洗浄した後、0.1 M Gly-HCl (pH 3.0) で、溶出、分画し、直ちに 1M Tris-HCl (pH 8.0) で中和した。

#### (実施例 7-2) MDTSP1 蛋白の組換えアグリカン G1G2 分解活性の検出

実施例 6 において、発現プラスミド導入後 12-16 時間で培地を無血清に置換した後、さらに 32-36 時間培養を継続し、培養上清を回収した。この培養上清と上記で調製した組換えアグリカンを混合し、37°C で 1 夜反応させ、SDS-PAGE 後、実施例 6 に記載した方法で、PVDF 膜に転写、プロッキング後、抗 His<sub>6</sub> ポリクローナル抗体 (sc-803 ; Santa Cruz Biotechnology 社製) 、西洋わさびペイオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギ IgG ポリクローナル抗体 (MBL 社製) を順次反応させた。反応後、ECL ウエスタンブロッティング検出システム (アマシャムファルマシア社製) を用いて組換えアグリカンを検出した。その結果、発現プラスミドのみを導入したコントロールではみられない組換えアグリカンの分解物が検出された (図 2) 。

#### (実施例 7-3) 抗アグリカナーゼネオエピトープ抗体による解析

アグリカナーゼはアグリカンの Glu<sup>373</sup>-Ala<sup>374</sup> の間を選択的に切断する金属プロテアーゼである。この切断により生じた C 側のネオエピトープを認識する抗体を常法に従い、配列番号 32 で示される合成ペプチドと KLH とのコンジュゲートをマウスに 5 回免疫を繰り返すことにより調製した。実施例 7-2 と同様に転写、プロッキングした PVDF 膜とこの抗体を反応させ、続いて、バーオキシダーゼ標識ヤギ抗マウス IgG ポリクローナル抗体 (Tago 社製) と反応させた後、ECL ウエスタンプロッティング検出システム (アマシャムファルマシア社製) を用いて検出した。その結果、MDTS6 により生じた組換えアグリカン G1G2 分解物が抗アグリカナーゼネオエピトープ抗体と反応し、検出されたバンドの分子量は実施例 7-2 で検出された分解物の分子量と一致した (図 3)。アグリカナーゼネオエピトープを認識する BC-3 抗体 (Hughes C. E. et al., Biochemical J. 305, 799-804, 1995) でも同じ結果が得られた。

#### (実施例 8) IL-1 による MDTS6 mRNA の発現誘導

マウス細胞株 ATDC5 はインスリン処理により軟骨様細胞へと分化することが知られている (Atsumi T. et al., Cell Differ. Dev. 30, 109-116, 1990)。I 型コラーゲンコート 6 ウエルプレート (旭テクノグラス社製) に ATDC5 細胞を  $4 \times 10^5$ /well で蒔き、DMEM/HamF12 (1:1)/5%FCS 培地で 2 日間培養した後、インスリン (終濃度 30ng/ml)、50  $\mu$  g/ml L-アスコルビン酸含有 DMEM/HamF12 (1:1)/5%FCS 培地に交換し 5 日培養を継続し、IL-1  $\beta$  (終濃度 5ng/ml) を添加して 0、1、2、4、8 時間処理した。各処理群より ISOGEN (日本ジーン社製) を用いて total RNA を調製し、その 1  $\mu$  g を鋳型として、BcaBEST<sup>TM</sup> RNA PCR Kit (宝酒造社製) を用い RT-PCR を行った。逆転写反応は添付の指示書に従い、Oligo dT-Adaptor primer をプライマーとして行い、PCR は MDTS6 の 3' 非翻訳領域の配列を基に合成した配列番号 15 および配列番号 16 で示されるオリゴ DNA をプライマーとして、94°C 2 分の後、94°C 30 秒、60°C 30 秒、72°C 30 秒のサイクルを 40 回、続いて 72°C 7 分の反応で行った。反応液を 1%アガロ

ースにて電気泳動し、生成した約 0.3 kbp のバンドの濃さを比較した。その結果、MDTS6 mRNA は IL-1 により一過性に発現誘導されることが判明した（図 4）。

（実施例 9）MDTS6 による天然型アグリカン分解

（実施例 9-1）各種短長 MDTS6 蛋白の発現と組換えアグリカン G1G2 分解活性

pCEP4dE2-FLAG を骨格として作製した発現プラスミドを FuGENE<sup>TM</sup>6 Transfection Reagent (Boehringer Mannheim 社製) を用いて添付指示書に従い HEK293-EBNA 細胞 (invirogen 社製) に導入した。プラスミド導入後、1 夜培養後、PBS 緩衝液で洗い、無血清培地に交換し、さらに 2-3 日間培養した。この培養液を 9,000 rpm、10 分で遠心分離し、上清を MDTS6 の酵素源とした。この際、実施例 4 および実施例 5 で示した発現プラスミド以外に、各種短長 MDTS6 蛋白の発現プラスミドとして、配列番号 1 の 1 番から 447 番のアミノ酸の C 末に配列番号 33 で示されるポリペプチドが付加した蛋白（以降、MDTS6Pro とする）、配列番号 1 の 1 番から 518 番のアミノ酸の C 末に配列番号 33 で示されるポリペプチドが付加した蛋白（以降、MDTS6Dis とする）、配列番号 1 の 1 番から 687 番のアミノ酸の C 末に配列番号 33 で示されるポリペプチドが付加した蛋白（以降、MDTS6Cys とする）の 3 つの蛋白の発現プラスミドをデザインした。すなわち、MDTS6Cys の発現プラスミドは、実施例 5 で構築した全長蛋白発現プラスミドを鋳型、配列番号 7 と配列番号 17 で示されるオリゴ DNA をプライマーとして、PyroBest DNA polymerase を用いた PCR にて増幅した遺伝子を制限酵素 XbaI、NotI で切断し pCEP4dE2-FLAG の XbaI、NotI 部位に挿入して構築した。また、MDTS6Pro の発現プラスミド、及び、MDTS6Dis の発現プラスミドは、上記 MDTS6Cys で作製したプラスミドと同様に作製し、具体的には PyroBest DNA polymerase を用いた PCR にて増幅した遺伝子を制限酵素 XbaI、NotI で切断し pCEP4dE2-FLAG の XbaI、NotI 部位に挿入して構築した。但し、PCR のプライマーとしては、MDTS6Pro の場合は、配列番号 7 で示されるオリゴ DNA と配列番号 34 で示され

るオリゴ DNA を用い、MDTS6Dis の場合は、配列番号 7 で示されるオリゴ DNA と配列番号 35 で示されるオリゴ DNA の組み合わせをそれぞれ用いた。

上述の各種 MDTS6 蛋白 (MDTS6Cys, MDTS6Pro, MDTS6Dis) の蛋白発現は、(実施例 6) に記載の MDTS6TSP1 及び MDTS6 全長蛋白の動物細胞株での発現と同様に発現させた。上述の各種 MDTS6 蛋白のアグリカナーゼ活性を実施例 7-3 の方法で検討した結果、MDTS6Cys を発現した培養上清にはアグリカナーゼ活性が検出されたが、MDTS6Pro, MDTS6Dis を発現した培養上清にはアグリカナーゼ活性が検出されなかった。なお、発現された主要な蛋白の分子量はアミノ酸配列から計算される値よりも約 23K 小さく、実施例 6 で示された MDTS6TSP1 と同じく、furin プロテアーゼ認識配列でプロ領域が切断・除去された成熟蛋白であった。この結果、N 末から数えて 1 個目の TSP-1 繰り返し配列が MDTS6 のアグリカナーゼ活性の発揮に必須であることが判明した。

#### (実施例 9-2) 天然型アグリカンの分解

実施例 9-1 で調製した MDTS6 酵素液 90  $\mu$  l と天然型アグリカン (生化学工業社製) 10  $\mu$  g/10  $\mu$  l TBS を試験チューブ内で混合し、37°C で一夜反応させた。この反応産物を SpeedVac にて乾燥した後、Chondroitinase ABC 0.06 単位 (生化学工業社製)、keratanase I 0.024 単位 (生化学工業社製)、keratanase II 0.0004 単位 (生化学工業社製)、5  $\mu$  M PMSF、10 mM EDTA を含む 10 mM Tris-Acetate 緩衝液 (pH7.6) 100  $\mu$  l に溶解し、37°C で一夜反応させた。この反応液の一部を SDS-PAGE 後、実施例 7-3 に示す通りにマウス抗アグリカナーゼネオエピトープ抗体で検出した。この際、パーオキシダーゼ標識ヤギ抗マウス IgG ポリクローナル抗体は Biosource 社製を用いた。アグリカナーゼネオエピトープを認識する BC-3 抗体 (Hughes C. E. et al, Biochemical J. 305, 799-804, 1995) でも同じ結果が得られた。

その結果、MDTS6Cys では約 150KDa のバンドに加え、80-90KDa のバンドが検出された。この切断パターンはヒトの OA、RA を含む関節疾患患者の関節滑

液中に認められる主要な分子（いずれもアグリカナーゼ分解で生じた）のパターン（Sandy J. D. et al, J. Clin. Invest., 89, 1512-1516, 1992; Lohmander L. S. et al., Arthritis Rheum. 36, 1214-1222, 1993）に一致し、また、ヒト膝関節軟骨の器官培養系において IL-1、レチノイン酸処理 12-24 時間で生じる主要なアグリカナーゼネオエピトープを有する分子のパターン（Little C. B. et al., Biochemical J., 344, 61-68, 1999）に一致した（図 5）。

#### （実施例 10）アグリカナーゼ活性を修飾する物質のスクリーニング系

##### （実施例 10-1）MDTS6Cys および基質の調製

MDTS6Cys は精製せずとも実施例 9-1 の方法で調整した培養上清で上記組換えアグリカン G1G2 および天然型アグリカンを Glu<sup>373</sup>-Ala<sup>374</sup>（以下、"aggrecanase site"）の間を切断することを、実施例 9-2 に示したウエスタンプロティングを用いた方法で確認した。また、実施例 9-1 で無血清培地に置換せず、10%FBS 含有培地で培養を継続した培養上清を用いても、"aggrecanase site"での切断が認められた。そのため、基質としては実施例 7-1 で調製した組換えアグリカン G1G2 を用いた。

##### （実施例 10-2）スクリーニング系

組換えアグリカンおよび天然型アグリカンを基質に実施例 7-2 に示したウエスタンプロティングを用いた方法でスクリーニング可能であるが、より大量の被験化合物をスクリーニングするために下記の ELISA 系を構築した。

MDTS6Cys 培養上清、組換えアグリカン G1G2、被験化合物を混合し、37°C にて数時間反応させた産物を 96 穴プレート（Nunc-Immuno<sup>TM</sup> Plate MaxiSorp<sup>TM</sup> Surface #439454；Nunc 社製）に吸着させ、1%BSA/TBS 溶液でブロッキングした後、マウス抗アグリカナーゼネオエピトープ抗体、続いて HRP コンジュゲート抗マウス IgG 抗体（Biosource 社製）を反応させ、添付説明書の条件にしたがい TMB Peroxidase EIA Substrate Kit（Bio-Rad 社製）で検出し、発色阻害を指標に被験化合物のアグリカナーゼ活性阻害強度を算出した。また、その変法

として、組換えアグリカンを予め 96 穴プレート (Nunc 社製) に吸着させ、1%BSA/TBS 溶液でプロッキングした後、MDTS6Cys 培養上清と被験化合物を添加し、37°Cにて数時間反応させた後、同様にマウス抗アグリカナーゼネオエピトープ抗体、続いて HRP コンジュゲート抗マウス IgG 抗体 (Biosource 社製) を反応させ、TMB Peroxidase EIA Substrate Kit (Bio-Rad 社製) で検出し、発色阻害を指標に被験化合物のアグリカナーゼ活性阻害強度を算出した。アグリカナーゼ活性を阻害する物質をスクリーニングする基準は、阻害活性強度 (IC<sub>50</sub>) において、好ましくは 10 μM 以下、さらに好ましくは 1.0 μM 以下である。

本スクリーニング系により、先に記載した化合物 A、化合物 B、化合物 C 及び化合物 D が選択することができた。アグリカナーゼ活性阻害強度 (IC<sub>50</sub>) は、化合物 A では 0. 6 μM、化合物 B では 1. 0 μM、化合物 C では 2. 9 μM、化合物 D では 2. 7 μM を示した。

なお、化合物 A、化合物 B、化合物 C 及び化合物 D は先に示した PCT 公開番号 WO90/05719 に記載された製造法と同様に合成された。それぞれの化合物のマススペクトルは以下の通りである。化合物 A は MS = 426 (MH<sup>+</sup>)、化合物 B は MS = 396 (MH<sup>+</sup>)、化合物 C は MS = 502 (MH<sup>+</sup>)、化合物 D は MS = 440 (MH<sup>+</sup>)。

#### (実施例 11)

##### (実施例 11-1) ウサギ膝関節軟骨初代培養細胞の調製

ウサギ (日本白色種、オス、1.0~1.5kg) を過剰麻酔下で致死させた後、膝関節を摘出し、関節表面の軟骨層をメスにて剥離、細断した。さらに、トリプシン-EDTA (0.25%-1mM; GIBCO-BRL 社製) にて 37°C、1 時間処理の後、1500rpm、5 分の遠心分離し沈殿を DMEM で洗浄した。続いてコラゲナーゼ A (0.15%; ベーリンガー・マンハイム社製) /DMEM にて 37°C、3~4 時間処理した後、ナイロン

メッシュフィルター（100  $\mu$  m、Falcon 社製）通過画分を 1500 rpm、5 分の遠心分離にかけ、軟骨細胞を沈殿させた。DMEM/10%FBS 培地で十分に洗浄した後、DMEM/10%FBS 培地に  $2 \times 10^5$  cells/ml になるように懸濁し、I 型コラーゲンをコートした 96 穴プレート（旭テクノグラス社製）に  $200 \mu$  l/穴で蒔いた。3 日後に培地を  $50 \mu$  g/ml アスコルビン酸含有 DMEM/10%FBS 培地（以下、アスコルビン酸培地） $200 \mu$  l に交換し、さらに 3 日間培養した。I 型コラーゲンをコートした 6 穴プレート（旭テクノグラス）を用いる場合は、上記細胞懸濁液を 6ml/穴で蒔き、同様に培地交換を行い培養した。これらの細胞を以下の実験に供した。

（実施例 11-2）ウサギ膝関節軟骨初代培養細胞のプロテオグリカン分解

実施例 11-1 で示した 96 穴プレートのウサギ膝関節軟骨初代培養細胞を終濃度  $10 \mu$  Ci/ml の  $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$  含有アスコルビン酸培地  $200 \mu$  l にて 2 日間培養、標識した後、 $200 \mu$  l のアスコルビン酸培地で 3 回洗浄し、 $200 \mu$  l のアスコルビン酸培地で 1 日間培養した。IL-1  $\beta$  および all-trans レチノイン酸で刺激し、0 時間後、24 時間後、48 時間後の培養上清を  $20 \mu$  l ずつ回収し、トップカウント（Packard 社製）を用い、放射活性を計測した。その結果、 $0.01 \sim 10 \text{ ng/ml}$  の IL-1  $\beta$  で放射活性の上昇、すなわちプロテオグリカンの遊離が認められ、 $0.1 \sim 10 \mu \text{M}$  の all-trans レチノイン酸で濃度依存的かつ強い放射活性の上昇、すなわちプロテオグリカンの遊離が認められた（図 6）。

（実施例 11-3）MDTS6 mRNA の発現誘導

実施例 11-1 で示した 6 穴プレートのウサギ膝関節軟骨初代培養細胞をアスコルビン培地に交換しさらに 3 日間培養した後、 $10 \text{ ng/ml}$  の IL-1  $\beta$  もしくは  $10 \mu \text{M}$  の all-trans レチノイン酸を添加し、2 時間後および 6 時間後の total RNA を ISOGEN（ニッポンジーン社製）を用いて添付の指示書に従い調製した。さらに、DNase I 处理（ニッポンジーン社製）を行い、フェノール/クロロホルム処理後、エタノール沈殿にて回収・精製した total RNA を DEPC 处理した滅菌水に溶解した。ランダムヘキサマーをプライマーとして、この total RNA  $1 \mu \text{g}$  を

Thermoscript<sup>TM</sup> RT-PCR System (GIBCO-BRL 社製カタログ番号 11146-016) を用い、添付の指示書に従い逆転写反応、RNase H処理を行ったものを滅菌水で10倍希釈し、cDNA サンプルとした。この cDNA サンプル各 5  $\mu$  l を鋳型、配列番号 18 および配列番号 19 で示されるオリゴ DNA をプライマーとして、94°C 2 分の後、94°C 30 秒、65°C 30 秒、72°C 30 秒のサイクルを 45 回、続いて 72°C 7 分の PCR 反応を行った。反応産物を 2% アガロースにて電気泳動し、生成した DNA 断片の濃さを比較した。その結果、MDTS6 mRNA は IL-1  $\beta$  および all-trans レチノイン酸により発現誘導し、その発現強度は実施例 11-2 におけるプロテオグリカン分解の程度と相関した（図 7）。

（実施例 12）アグリカナーゼ活性を阻害する物質によるウサギ膝関節軟骨初代培養細胞のプロテオグリカン分解抑制

実施例 10-2 のスクリーニング系により選択された化合物 A、化合物 B、化合物 C 及び化合物 D を実施例 11-1 で示したウサギ膝関節軟骨初代培養細胞のプロテオグリカン分解系に 10  $\mu$  M の all-trans レチノイン酸刺激直前に添加し、その抑制作用を検討した。その結果、化合物 A 及び化合物 B は濃度依存的に抑制作用を示した（図 8）。化合物 C 及び化合物 D のプロテオグリカン分解抑制作用 (IC<sub>50</sub>) は、化合物 C は 6. 3  $\mu$  M、化合物 D は 4. 1  $\mu$  M となった。一方、同じヒドロキサム酸骨格を持つがアグリカナーゼ活性阻害が弱い化合物では 100  $\mu$  M でもプロテオグリカンの分解抑制作用は認められなかった。

（実施例 13）MDTS6 プロモーター領域 DNA 配列の解析

MDTS6 のプロモーター領域に相当する DNA は GenomeWalker DNA Sca I Libraries (genome walker<sup>TM</sup> Kits, CLONTECH 社カタログ番号 K1803-1) より、PCR 法を用いて増幅した。forward primer としてキット添付のアダプタープライマー AP-1 (配列番号 20)、AP-2 (配列番号 21) のオリゴ DNA を、reverse primer として配列番号 22、配列番号 23 のオリゴ DNA を用いた。具体的な方法はキットの添付説明書通りであるが、PCR には TAKARA LA Taq (TAKARA LA Taq<sup>TM</sup>、カタ

ログ番号 RR002A) を用いた。1回目の PCR 反応はプライマーとして配列番号 20 と配列番号 22 のオリゴ DNA を用い、98℃5 秒、72℃3 分のサイクルを 7 回、98℃5 秒、67℃3 分のサイクルを 32 回、67℃4 分であった。2回目の反応は1回目の反応溶液を TE 緩衝液(10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)を用いて 50 倍希釈したもの 5  $\mu$  l を鋳型、配列番号 21 と配列番号 23 のオリゴ DNA をプライマーとして、上記と同じ条件で行った。増幅された約 3.7 kbp の DNA 断片を直接 dideoxy terminator 法により ABI377 DNA Sequencer (Applied Biosystems Inc) にて配列解析した結果、解読できない 2ヶ所のギャップで分断された約 2.2 kbp, 0.36 kbp, 0.8 kbp の DNA 配列が明らかになった。

次に、PCR 増幅 DNA 断片の直接解析で解読できなかった 2ヶ所のギャップ部の配列を判読するために、この DNA 断片をサブクローニングして、DNA の塩基配列の決定を行った。その結果、該ギャップ部の配列は決定した 8 クローン(配列番号 24、25、26、27、28、29、30 及び 31) で異なり、遺伝子多型の存在が示唆された。なお、クローニングベクターとしては pZEr0™-2 vector (Zero Background/ Kan Cloning Kit, Invitrogen 社製、カタログ番号 K2600-01) を用いて、サブクローニングの操作は添付の説明書に従った。

上記 DNA 断片をレポータープラスミド pGV-B2(東洋インキ社製)の KpnI、XhoI 部位に挿入したプラスミドを FuGene-6 を用い HEK293 細胞に導入し、通常の培養条件で 28 時間または 48 時間培養後のルシフェラーゼ活性を、PicaGene 発色キット(東洋インキ社製、カタログ番号 PGK-L100)を用いて測定した。この際、測定値は同時導入した  $\beta$ -gal 発現プラスミド pCH110(アマシャムファルマシアバイオテック社製、カタログ番号 27-4508-01) より発現した  $\beta$ -gal の活性値で補正した。 $\beta$ -gal 活性の測定は Galacto-Light Plus キット (TROPIX 社製、カタログ番号 BL300P) を用いた。その結果、もとのプラスミドである pGV-B2 では認められないルシフェラーゼ活性の明らかな上昇が観察された。このことは上記 DNA 断片中にプロモーター活性が存在することを示している。

-40-

#### (実施例 14) 変形性関節症患者の関節組織での MDTS6 発現

変形性関節症患者の疾患部の膝関節軟骨より total RNA を調製し (Adams M. E. , et al., Anal. Biochem., 202, 89-95, 1992) 、これを鋳型として実施例 11-3 に準じて RT-PCR を行うことにより、MDTS6 mRNA の存在を確認した。また、マウス抗ヒト MDTS6 特異的ポリクローナル抗体を用いた免疫組織染色を行い、滑膜組織およびマクロファージに MDTS6 蛋白の存在を確認した。

なお、マウス抗ヒト MDTS6 特異的ポリクローナル抗体は以下の如く調製した。まず、実施例 6 で調製したヒト MDTS6TSP1 蛋白を KLH とコンジュゲートし、マウスに 4-5 回免疫した後、抗血清を調製した。続いて、この抗血清より、Protein G Sepharase 4 Fast Flow (Amasham Pharmacia Biotech 社製) を用い、添付指示書に従い、IgG を調製した。さらに、添付指示書に従い、ヒト MDTS6TSP1 蛋白を CNBr-activated Sepharose 4 Fast Flow (Amasham Pharmacia Biotech 社製) に固定したカラムを作製した。このカラムに結合し、対応するヒト ADAMTS4TSP1 蛋白 (aggrecanase-1; Tortorella M. D. et al., Science., 284, 1664-1666, 1999) 、METH-1TSP1 蛋白 (Vazquez F. et al., J. Biol. Chem., 274, 23349-57, 1999) 、METH-2TSP1 蛋白 (Vazquez F. et al., J. Biol. Chem., 274, 23349-57, 1999) を固定したカラムに結合しない分画を調製した。

#### 産業上の利用可能性

本発明で得られた「関節疾患アグリカナーゼ」は、アグリカナーゼ活性を有することにより、該アグリカナーゼを有意に阻害する物質（化合物、ペプチド、抗体又は抗体断片）のスクリーニングに用いられることを特徴としている。ここで、該「関節疾患アグリカナーゼ」を有意に阻害する物質の医薬用途としては該アグリカナーゼ活性の亢進、低下、変性等の異常に起因するあるいは該異常を発現・併発する疾患の内、特にプロテオグリカン分解亢進を示す疾患であ

る関節疾患、なかでも変形性関節症の予防・治療に有効であることが示唆される。

さらに、本発明の「関節疾患アグリカナーゼ」のプロモーター遺伝子は、該遺伝子のプロモーター活性を阻害する物質（化合物、ペプチド、抗体又は抗体断片）をスクリーニングに用いられることを特徴としてする。該プロモーター活性を阻害する物質の用途としては、プロモーター活性の阻害に起因する疾患の内、特にプロテオグリカン分解亢進を示す疾患である関節疾患、なかでも変形性関節症の予防・治療に有効であることが示唆される。また、該プロモーター遺伝子には複数の変異体が存在することより、上記疾患との相関解析に用いられる。

## 請求の範囲

1. 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の第 213 番から第 583 番のアミノ酸配列を含むアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物。
2. 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の第 1 番から第 583 番のアミノ酸配列を含むアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物。
3. 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の第 1 番から第 687 番のアミノ酸配列、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の第 1 番から第 583 番のアミノ酸配列、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の第 213 番から第 950 番のアミノ酸配列、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の第 213 番から第 687 番のアミノ酸配列、若しくは、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の第 213 番から第 583 番のアミノ酸配列を有するアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物。
4. 請求の範囲 1 乃至 3 の何れかに記載のアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物のアミノ酸配列をコードする遺伝子。
5. 請求の範囲 4 に記載の遺伝子を含むベクター。
6. 請求の範囲 5 に記載のベクターを含む宿主細胞。
7. 請求の範囲 6 に記載の宿主細胞を用いることを特徴とする、請求の範囲 1 乃至 3 の何れかに記載のアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物の製造方法。
8. 請求の範囲 1 乃至 3 の何れかに記載のアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物に対する抗体。
9. 請求の範囲 1 乃至 3 の何れかに記載のアグリカナーゼ活性を有する金属プロ

ロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物と被験化合物とを接触させることを特徴とする、当該金属プロテアーゼのアグリカナーゼ活性を阻害する物質をスクリーニングする方法。

10. 請求の範囲1乃至3に記載のアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物を阻害する物質を有効成分とするプロテオグリカン分解抑制用医薬組成物。

11. 配列番号24、25、26、27、28、29、30若しくは31で表される遺伝子、又は該遺伝子の同効物。

## 補正書の請求の範囲

[2001年4月19日(19. 04. 01)国際事務局受理:出願当初の請求の範囲1-4及び7-11は補正された;他の請求の範囲は変更なし。(2頁)]

1. (補正後) 配列番号1で表されるアミノ酸配列の第213番から第583番のアミノ酸配列を含むアグリカナーゼ活性を有する、或いは、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第213番から第583番のアミノ酸配列の中のいずれかの1乃至10個の部位において、アミノ酸残基が置換、欠失、及び/または挿入されていて、かつ、アグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ。
2. (補正後) 配列番号1で表されるアミノ酸配列の第1番から第583番のアミノ酸配列を含むアグリカナーゼ活性を有する、或いは、第1番から第583番のアミノ酸配列の中のいずれかの1乃至10個の部位において、アミノ酸残基が置換、欠失、及び/または挿入されていて、かつ、アグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ。
3. (補正後) 配列番号1で表されるアミノ酸配列、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第1番から第687番のアミノ酸配列、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第1番から第583番のアミノ酸配列、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第213番から第950番のアミノ酸配列、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第213番から第687番のアミノ酸配列、若しくは、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第213番から第583番のアミノ酸配列を有するアグリカナーゼ活性を有する、或いは、それぞれの配列の中のいずれかの1乃至10個の部位において、アミノ酸残基が置換、欠失、及び/または挿入されていて、かつ、アグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ。
4. (補正後) 請求の範囲1乃至3の何れかに記載のアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼのアミノ酸配列をコードする遺伝子。
5. 請求の範囲4に記載の遺伝子を含むベクター。
6. 請求の範囲5に記載のベクターを含む宿主細胞。
7. (補正後) 請求の範囲6に記載の宿主細胞を用いることを特徴とする、請求の範囲1乃至3の何れかに記載のアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼの製造方法。
8. (補正後) 請求の範囲1乃至3の何れかに記載のアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼに対する抗体。
9. (補正後) 請求の範囲1乃至3の何れかに記載のアグリカナーゼ活性を有する金

属プロテアーゼと被験化合物とを接触させることを特徴とする、当該金属プロテアーゼのアグリカナーゼ活性を阻害する物質をスクリーニングする方法。

10. (補正後) 請求の範囲1乃至3に記載のアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼを阻害する物質を有効成分とするプロテオグリカン分解抑制用医薬組成物。

11. (補正後) 配列番号24、25、26、27、28、29、30若しくは31で表される遺伝子、或いは、配列番号24、25、26、27、28、29、30若しくは31記載の塩基配列の中のいずれかの1乃至10個の部位において、塩基が置換、欠失、及び／又は挿入されていて、かつ、関節疾患アグリカナーゼプロモーター活性を有する遺伝子。



図 1

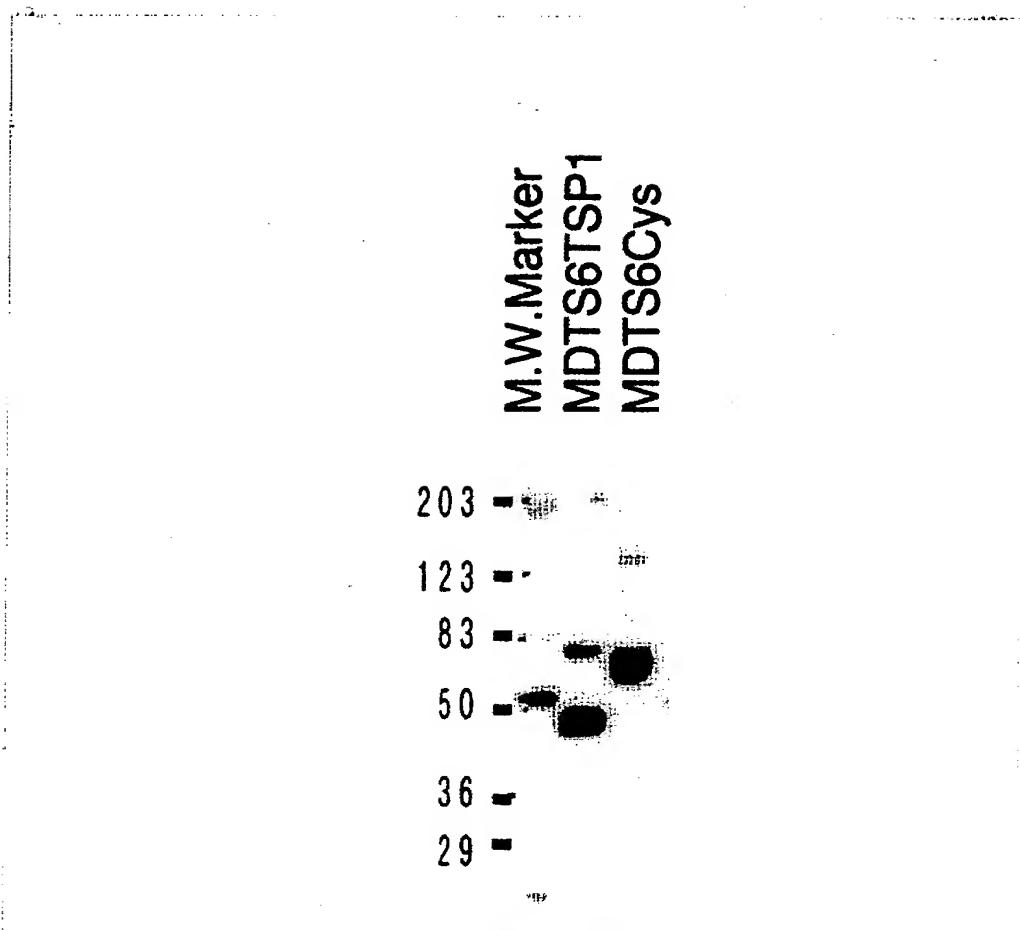
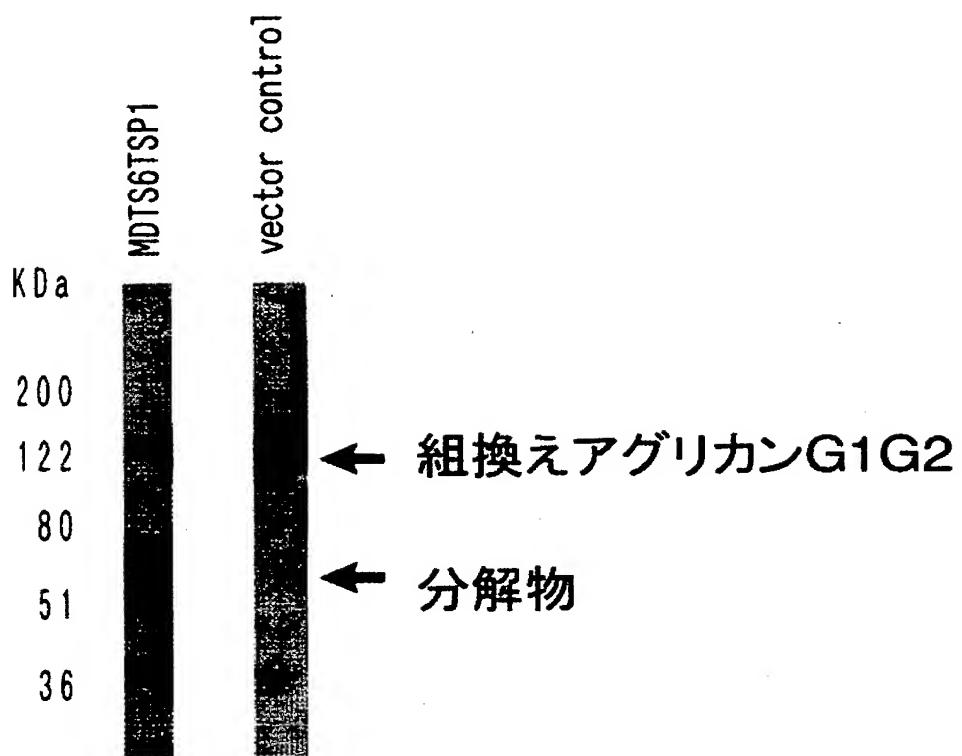




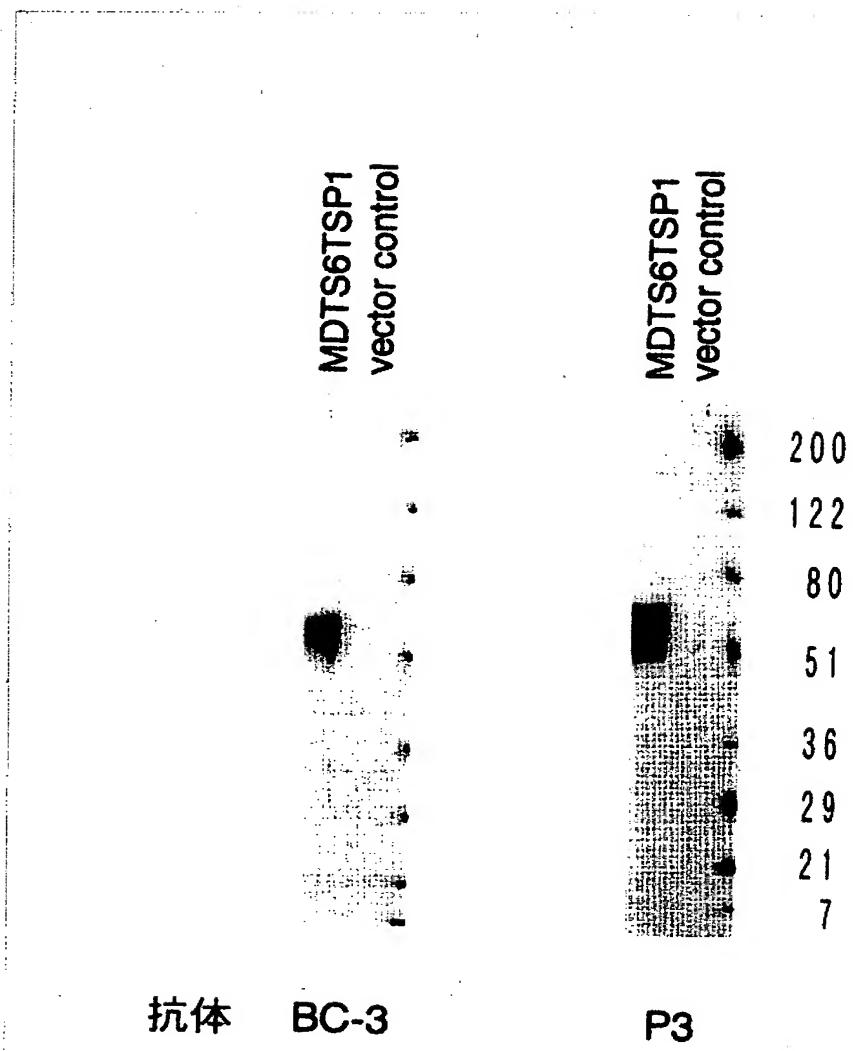
図 2





3/8

図 3



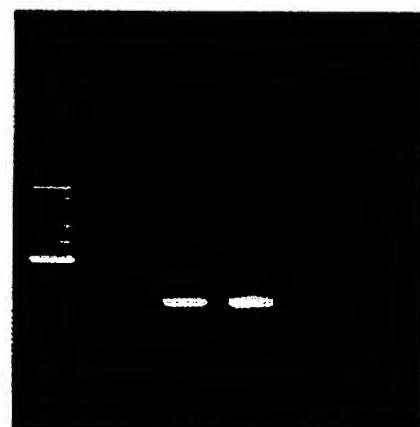
差替え用紙(規則26)



4/8

図 4

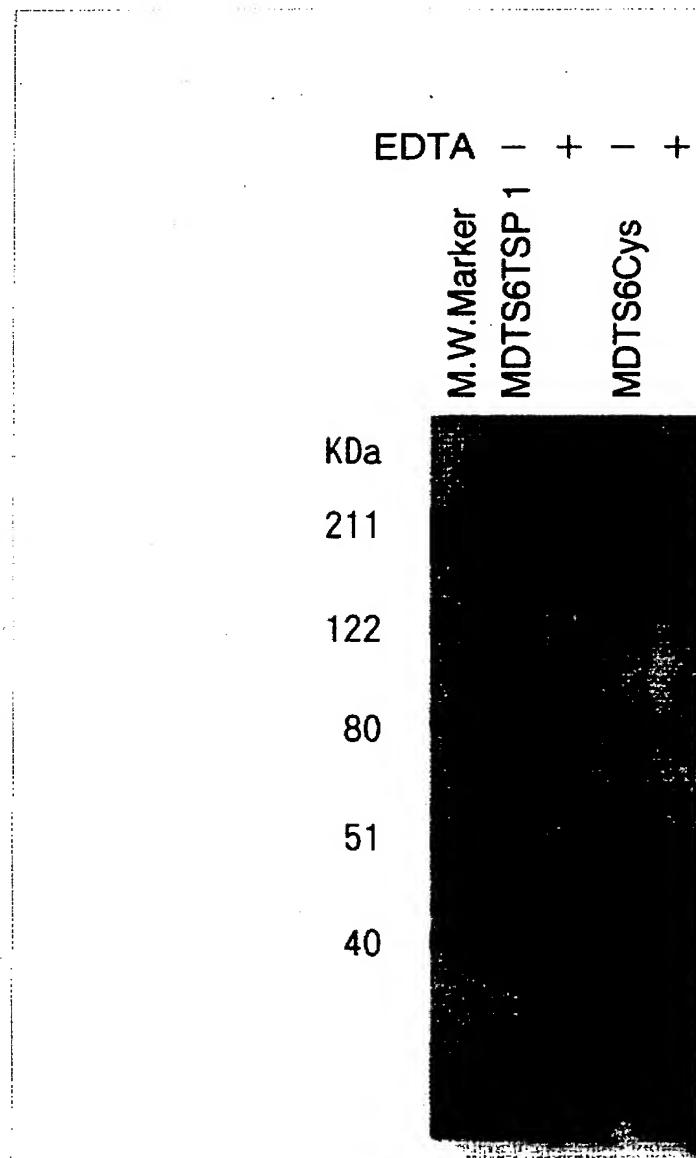
IL-1 处理 (時間) 0 1 2 4 8



差替え用紙 (規則26)



図 5



差替え用紙(規則26)



図 6

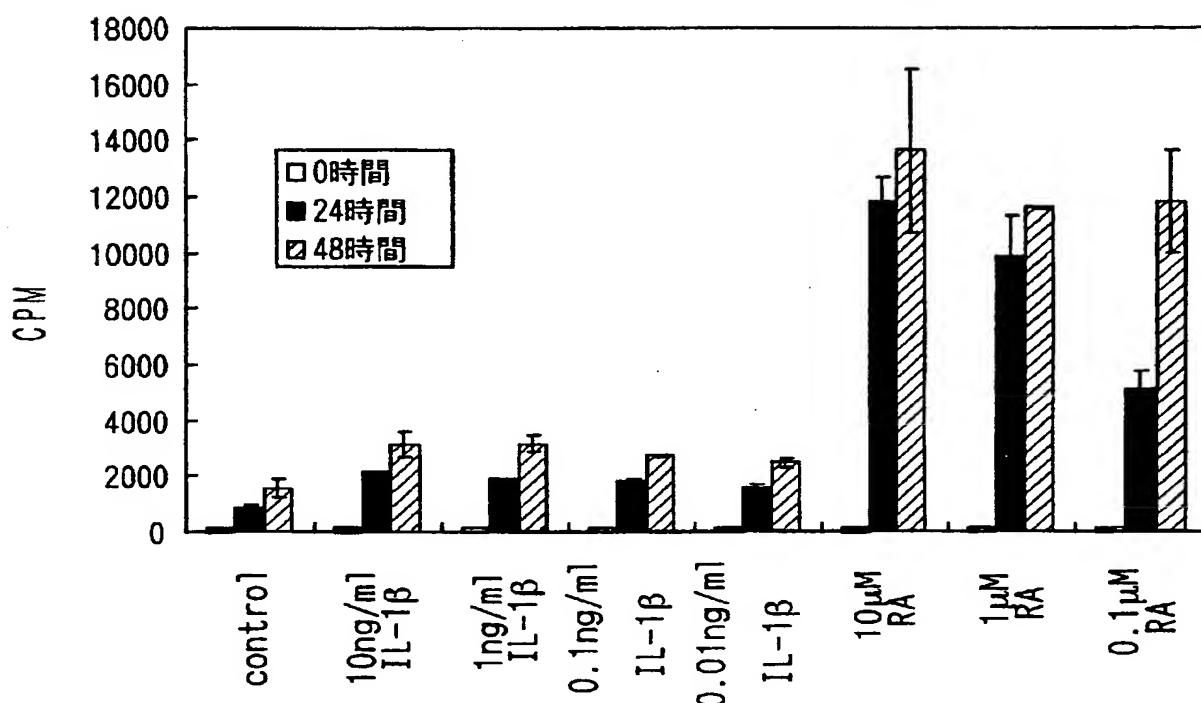
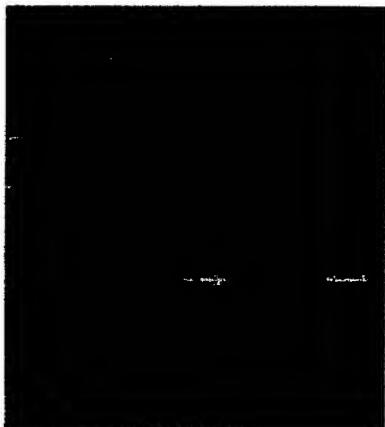




図 7

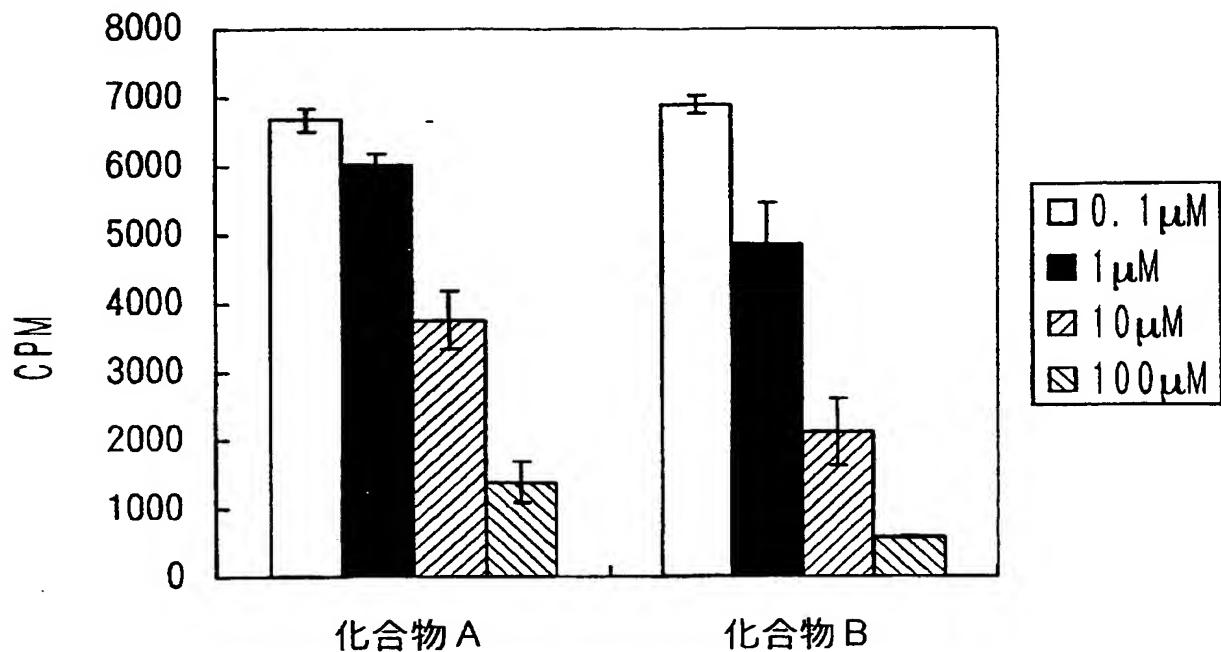
1 2 3 4 5



- 1: 非処理
- 2: IL-1 $\beta$  2時間処理
- 3: R.A. 2時間処理
- 4: IL-1 $\beta$  6時間処理
- 5: R.A. 6時間処理



図 8





## SEQUENCE LISTING

<110> Kazusa DNA Research Institute  
Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd.

<120> Novel metalloprotease having an activity of aggrecanase

<130> YK0029

<140>

<141>

<150>JP 1999-321740

<151>1999-11-11

<150>JP 2000-144020

<151>2000-5-16

<160> 35

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 950

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Leu Leu Leu Gly Ile Leu Thr Leu Ala Phe Ala Gly Arg Thr Ala

1 5 10 15

Gly Gly Phe Glu Pro Glu Arg Glu Val Val Val Val Pro Ile Arg Leu Asp

20 25 30

Pro Asp Ile Asn Gly Arg Arg Tyr Tyr Trp Arg Gly Pro Glu Asp Ser

35 40 45

Gly Asp Gln Gly Leu Ile Phe Gln Ile Thr Ala Phe Gln Glu Asp Phe

50 55 60



Tyr Leu His Leu Thr Pro Asp Ala Gln Phe Leu Ala Pro Ala Phe Ser  
65 70 75 80  
Thr Glu His Leu Gly Val Pro Leu Gln Gly Leu Thr Gly Gly Ser Ser  
85 90 95  
Asp Leu Arg Arg Cys Phe Tyr Ser Gly Asp Val Asn Ala Glu Pro Asp  
100 105 110  
Ser Phe Ala Ala Val Ser Leu Cys Gly Gly Leu Arg Gly Ala Phe Gly  
115 120 125  
Tyr Arg Gly Ala Glu Tyr Val Ile Ser Pro Leu Pro Asn Ala Ser Ala  
130 135 140  
Pro Ala Ala Gln Arg Asn Ser Gln Gly Ala His Leu Leu Gln Arg Arg  
145 150 155 160  
Gly Val Pro Gly Gly Pro Ser Gly Asp Pro Thr Ser Arg Cys Gly Val  
165 170 175  
Ala Ser Gly Trp Asn Pro Ala Ile Leu Arg Ala Leu Asp Pro Tyr Lys  
180 185 190  
Pro Arg Arg Ala Gly Phe Gly Glu Ser Arg Ser Arg Arg Ser Gly  
195 200 205  
Arg Ala Lys Arg Phe Val Ser Ile Pro Arg Tyr Val Glu Thr Leu Val  
210 215 220  
Val Ala Asp Glu Ser Met Val Lys Phe His Gly Ala Asp Leu Glu His  
225 230 235 240  
Tyr Leu Leu Thr Leu Leu Ala Thr Ala Ala Arg Leu Tyr Arg His Pro  
245 250 255  
Ser Ile Leu Asn Pro Ile Asn Ile Val Val Val Lys Val Leu Leu  
260 265 270  
Arg Asp Arg Asp Ser Gly Pro Lys Val Thr Gly Asn Ala Ala Leu Thr  
275 280 285  
Leu Arg Asn Phe Cys Ala Trp Gln Lys Lys Leu Asn Lys Val Ser Asp  
290 295 300  
Lys His Pro Glu Tyr Trp Asp Thr Ala Ile Leu Phe Thr Arg Gln Asp  
305 310 315 320  
Leu Cys Gly Ala Thr Thr Cys Asp Thr Leu Gly Met Ala Asp Val Gly  
325 330 335  
Thr Met Cys Asp Pro Lys Arg Ser Cys Ser Val Ile Glu Asp Asp Gly  
340 345 350



Leu Pro Ser Ala Phe Thr Thr Ala His Glu Leu Gly His Val Phe Asn  
355 360 365  
Met Pro His Asp Asn Val Lys Val Cys Glu Glu Val Phe Gly Lys Leu  
370 375 380  
Arg Ala Asn His Met Met Ser Pro Thr Leu Ile Gln Ile Asp Arg Ala  
385 390 395 400  
Asn Pro Trp Ser Ala Cys Ser Ala Ala Ile Ile Thr Asp Phe Leu Asp  
405 410 415  
Ser Gly His Gly Asp Cys Leu Leu Asp Gln Pro Ser Lys Pro Ile Ser  
420 425 430  
Leu Pro Glu Asp Leu Pro Gly Ala Ser Tyr Thr Leu Ser Gln Gln Cys  
435 440 445  
Glu Leu Ala Phe Gly Val Gly Ser Lys Pro Cys Pro Tyr Met Gln Tyr  
450 455 460  
Cys Thr Lys Leu Trp Cys Thr Gly Lys Ala Lys Gly Gln Met Val Cys  
465 470 475 480  
Gln Thr Arg His Phe Pro Trp Ala Asp Gly Thr Ser Cys Gly Glu Gly  
485 490 495  
Lys Leu Cys Leu Lys Gly Ala Cys Val Glu Arg His Asn Leu Asn Lys  
500 505 510  
His Arg Val Asp Gly Ser Trp Ala Lys Trp Asp Pro Tyr Gly Pro Cys  
515 520 525  
Ser Arg Thr Cys Gly Gly Val Gln Leu Ala Arg Arg Gln Cys Thr  
530 535 540  
Asn Pro Thr Pro Ala Asn Gly Gly Lys Tyr Cys Glu Gly Val Arg Val  
545 550 555 560  
Lys Tyr Arg Ser Cys Asn Leu Glu Pro Cys Pro Ser Ser Ala Ser Gly  
565 570 575  
Lys Ser Phe Arg Glu Glu Gln Cys Glu Ala Phe Asn Gly Tyr Asn His  
580 585 590  
Ser Thr Asn Arg Leu Thr Leu Ala Val Ala Trp Val Pro Lys Tyr Ser  
595 600 605  
Gly Val Ser Pro Arg Asp Lys Cys Lys Leu Ile Cys Arg Ala Asn Gly  
610 615 620  
Thr Gly Tyr Phe Tyr Val Leu Ala Pro Lys Val Val Asp Gly Thr Leu  
625 630 635 640



Cys Ser Pro Asp Ser Thr Ser Val Cys Val Gln Gly Lys Cys Ile Lys  
645 650 655  
Ala Gly Cys Asp Gly Asn Leu Gly Ser Lys Lys Arg Phe Asp Lys Cys  
660 665 670  
Gly Val Cys Gly Gly Asp Asn Lys Ser Cys Lys Lys Val Thr Gly Leu  
675 680 685  
Phe Thr Lys Pro Met His Gly Tyr Asn Phe Val Val Ala Ile Pro Ala  
690 695 700  
Gly Ala Ser Ser Ile Asp Ile Arg Gln Arg Gly Tyr Lys Gly Leu Ile  
705 710 715 720  
Gly Asp Asp Asn Tyr Leu Ala Leu Lys Asn Ser Gln Gly Lys Tyr Leu  
725 730 735  
Leu Asn Gly His Phe Val Val Ser Ala Val Glu Arg Asp Leu Val Val  
740 745 750  
Lys Gly Ser Leu Leu Arg Tyr Ser Gly Thr Gly Thr Ala Val Glu Ser  
755 760 765  
Leu Gln Ala Ser Arg Pro Ile Leu Glu Pro Leu Thr Val Glu Val Leu  
770 775 780  
Ser Val Gly Lys Met Thr Pro Pro Arg Val Arg Tyr Ser Phe Tyr Leu  
785 790 795 800  
Pro Lys Glu Pro Arg Glu Asp Lys Ser Ser His Pro Lys Asp Pro Arg  
805 810 815  
Gly Pro Ser Val Leu His Asn Ser Val Leu Ser Leu Ser Asn Gln Val  
820 825 830  
Glu Gln Pro Asp Asp Arg Pro Pro Ala Arg Trp Val Ala Gly Ser Trp  
835 840 845  
Gly Pro Cys Ser Ala Ser Cys Gly Ser Gly Leu Gln Lys Arg Ala Val  
850 855 860  
Asp Cys Arg Gly Ser Ala Gly Gln Arg Thr Val Pro Ala Cys Asp Ala  
865 870 875 880  
Ala His Arg Pro Val Glu Thr Gln Ala Cys Gly Glu Pro Cys Pro Thr  
885 890 895  
Trp Glu Leu Ser Ala Trp Ser Pro Cys Ser Lys Ser Cys Gly Arg Gly  
900 905 910  
Phe Gln Arg Arg Ser Leu Lys Cys Val Gly His Gly Gly Arg Leu Leu  
915 920 925



Ala Arg Asp Gln Cys Asn Leu His Arg Lys Pro Gln Glu Leu Asp Phe

930

935

940

Cys Val Leu Arg Pro Cys

945

950

<210> 2

<211> 2853

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

atgctttgc tggcattcct aaccctggct ttcggccggc gaaccgctgg aggcttttag 60  
ccagagcggg aggtatcggt tcccatccga ctggacccgg acattaacgg cccggctac 120  
tactggcggg gtcccgagga ctccggggat cagggactca ttttcagat cacagcatt 180  
caggaggact ttacatcaca cctgacgccc gatgctcagt tcttggctcc cgccttctcc 240  
actgagcatac tggcgtccc ctcacccggg gctcttcaga cctgcgacgc 300  
tgcttctatt ctggggacgt gaacgcccgg cccggactcg tgcgtgtgt gaggctgtgc 360  
ggggggctcc gcggagccctt tggctaccga ggcgcccggat atgtcattag cccgtgtccc 420  
aatgcttagcg cgccggcggc gcagcgcaac agccaggcg cacacccctt ccagcgccgg 480  
ggtgttccgg gcggggccctt cggagacccc acctctcgct gcgggggtggc ctggggctgg 540  
aaccggccca tccatcgggc cctggaccct tacaagccgc ggcggccggg cttcggggag 600  
agtcttagcc ggcgcagggtc tggcgcgc aagcgttcg tgtctatccc gcggtacgtg 660  
gagacgctgg tggtcgcgga cgagtcaatg gtcaagttcc acggcgcggaa cctggaaacat 720  
tatctgtga cgctgctggc aacggccggcg cgactctacc gccatccccag catcctcaac 780  
cccatcaaca tcgttgtggt caaggtgctg cttcttagag atcgtgactc cggggccaaag 840  
gtcaccggca atgcggccct gacgctgcgc aacttctgtg cctggcagaa gaagctgaac 900  
aaagttagtg acaaggacccc cgagtactgg gacactgcca tcctttcac caggcaggac 960  
ctgtgtggag ccaccacctg tgacacccctg ggcattggctg atgtgggtac catgtgtgac 1020  
cccaagagaa gctgctgtt cattgaggac gatgggcttc catcagccctt caccactgccc 1080  
cacgagctgg gccacgtgtt caacatgccc catgacaatg tgaaagtctg tgaggagggt 1140  
tttgggaagg tccgagccaa ccacatgatg tccccgaccc tcatccagat cgaccgtgcc 1200  
aacccttgtt cagccctgcag tgctgcccattt atcaccgact tcctggacag cgggcacgg 1260  
gactgcctcc tggaccaacc cagcaagccc atctccctgc ccgaggatct gccggggcc 1320  
agctacacccc tgagccagca gtgcgagctg gctttggcg tggcgtccaa gcccgtgc 1380  
tacatgcagt actgcaccaa gctgtggtgc accgggaagg ccaagggaca gatgggtgtgc 1440



cagaccggcc acttccctg ggccgatggc accagctgtg gcgagggcaa gctctgcctc 1500  
aaaggggcct gcgtggagag acacaaccc acacaaccc aacaaggcaca gggtggatgg ttccctggcc 1560  
aaatgggatc cctatggccc ctgcgcgc acatgtggtg ggggcgtgca gctggccagg 1620  
aggcagtgca ccaacccac ccctgccaac gggggcaagt actgcgaggg agtgagggtg 1680  
aaataccat cctgcaacct ggagccctgc cccagctcag cctccggaaa gagcttccgg 1740  
gaggagcagt gtgaggctt caacggctac aaccacagca ccaaccggct cactctgc 1800  
gtggcatgg tgcccaagta ctccggcgtg tctccccggg acaagtgcaa gctcatctgc 1860  
cgagccaaatg gcactggcta cttctatgtg ctggcaccca aggtggtgga cggcacgctg 1920  
tgctctcctg actccaccc cgtctgtgtc caaggcaagt gcatcaaggc tggctgtgat 1980  
gggaacctgg gctccaagaa gagattcgac aagtgtggg tgggtgggg agacaataag 2040  
agctgcaaga aggtgactgg actcttcacc aagcccatgc atggctacaa tticgtggtg 2100  
cccatcccc caggcgccctc aagcatcgac atccgcccagc gcggttacaa agggctgatc 2160  
ggggatgaca actacctggc tctgaagaac agccaaggca agtacctgct caacggcat 2220  
ttcgtggtgt cggcggtgga gcgggacctg ggggtgaagg gcagtctgct gcggtacagc 2280  
ggcacgggca cagcggtgga gagcctgcag gcttcccgcc ccatcttggc ggcgtgacc 2340  
gtggagggtcc tctccgtggg gaagatgaca ccgccccggg tccgctactc cttctatctg 2400  
cccaaagagc ctccggagga caagtccctc catcccaagg acccccgggg accctctgtc 2460  
ttgcacaaca gcgtccctcag cctctccaac caggtggagc agccggacga caggccccct 2520  
gcacgctggg tggctggcag ctggggcccg tgctccgcga gctgcccgcag tggctgcag 2580  
aagcgggccc tggactgccc gggctccccc gggcagcgcga cggtccctgc ctgtgatgca 2640  
gcccatcgcc cctgtggagac acaagcctgc ggggagccct gccccacccctg ggagctcagc 2700  
gcctggtcac cctgctccaa gagctgcggc cggggatttc agagggcgtc actcaagtgt 2760  
gtggccacg gaggccggct gctggccccc gaccagtgca acttgcacccg caagccccag 2820  
gagctggact tctgcgtcct gaggccgtgc tga 2853

<210> 3

<211> 50

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

ctagcgcggc cgcaggatcc gactacaagg acgacgtatgcaaaatgataa 50

<210> 4

<211> 50



<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

gatcttatca ttgtcatcg tcgtccctgt agtcggatcc tgcggccgcg 50

<210> 5

<211> 34

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

ggactagctc agaagctggg taccagctgc tagc 34

<210> 6

<211> 29

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 6

ggactagtgt cgaccggta tggctgcgc 29

<210> 7

<211> 42

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

gtgtcttagag ccatgctttt gctgggcatac ctaaccctgg ct 42

<210> 8

<211> 41

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 8



agagcggccg cctgctcctc ccggaagctc tttccggagg c 41

<210> 9

<211> 27

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 9

aagcacaggg tggatggttc ctgggcc 27

<210> 10

<211> 37

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 10

gcgcggccgc gcacggcctc aggacgcaga agtccag 37

<210> 11

<211> 37

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 11

taggatcctt gtagaaactt cagaccatga caactcg 37

<210> 12

<211> 59

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 12

atggatcctc aatggtgatg gtgatgatga ccgaagcaga aggcattggtg ccggacag 59

<210> 13

<211> 97



<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 13

agcttgcac catgaagacg atcatcgccc tgagctacat ctctgcctg gtattgcgg 60  
actacaagga cgtatgtac aaggggatcc actagtc 97

<210> 14

<211> 97

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 14

tcgagactag tggatccct tgcatcatc gtcctttag tcggcgaata ccaggcagaa 60  
gatgtagctc agggcgatga tcgtctcat ggiggca 97

<210> 15

<211> 30

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 15

acctcagcag ccagctccct tgtatacaca 30

<210> 16

<211> 30

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 16

cttgggggg atggaccaat acagcttgg 30

<210> 17

<211> 38

<212> DNA

<213> Homo sapiens



<400> 17

agagcggccg ctccagtcac cttcttgcag ctcttatt

38

<210> 18

<211> 27

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 18

gcggacgagt ccatggtcaa gttccac

27

<210> 19

<211> 27

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 19

ttctgccagg cgcagaagtt gcgcagc

27

<210> 20

<211> 22

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 20

gttaatacgac tcactatagg gc

22

<210> 21

<211> 19

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 21

actatagggc acgcgtggt

19



<210> 22  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 22  
actgagcatc cggcgtcagg tgttaggtaaa 30

<210> 23  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 23  
agtccctcctg aaatgctgtg atctgaaaaaa 30

<210> 24  
<211> 3473  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> promoter  
<222>

<400> 24  
ttgcacagct aagatctgggt ggaggcatgc acacagggcc ctctgaccat gggctctaaa 60  
tcactgtact atgttccctt ccataggcct caatcagtca tggatattt gacctggtc 120  
ttatcttagg tattatcttag accacagatt ttggatgcag ttctctggct gaagacctct 180  
gagctaggat aacccttct ctttgacag acgagtcaga gaatcagatc agtgcata 240  
gtggatgtgcc aatccctgagt atcacctcta ctcaagtgc caacatatcc ctagatcctc 300  
aattccctgg caaaagtgtat tggatggaac cacaggcttc caagagggga cagtcaagca 360  
ttaaaatacga gaatgcacat ataactcttg gtgcaatgtt tagcacatac taagcctgca 420  
atacatgcta atcccttga gcaaattccac atggccagtt tctgtgctca ggggtgagaa 480  
tagctgggct gtgattgggg cagggggagc actaagtggg agggacttcc tgtctcagg 540  
ccctgcccattc ttgactgaca tgctgcagcc ctggccaaaa cccatgggtc agaatgaaag 600



taaagtgcgg ttgaaaacct tgcaatccac cttaaaact gccgggtgta gtaaaacaat 660  
tgcttgcccc aaataaatga ctatcattg ctgttggttg tctgcgttc tcttaatta 720  
taggccctct ttgaacgctc aaacacacag ggcctttgta agcttgaact ccctgtctca 780  
cacacagtcc tcccataaccc atacactctc tttcatttgc agagtataaa caccatctc 840  
tcactcattc acataatgaa tttcagctcc ttgtgtccca atcaaggaga ggcctcactg 900  
gaattatggg catctgagcc atcttcatgt tccaaggccc cagggggcgc ttccaagagt 960  
ggatccctta tggggagaag ataatggca aaaagtgctc ttcaactgatg gaccagtccc 1020  
agccctttct ctccctggac aatagagttc ttcccttgc aa cagccacttc cctaaaaaaa 1080  
attccaaaat tctcccacat catcccttt atgcttaaaa tcatcacaca ctcccttctt 1140  
tgtccctcccc tcttgcaaac tcaactcaga gccccttggc tccagaaaga ttttcttaggt 1200  
atcaggagag agtagcaaag cctccctctt ctcccttgcct ttctcccttg tcagagaaag 1260  
aagtgttctc caaactagat gggAACATAA ggtgcgatttgc catcttctcc agctgatact 1320  
cactcggcct cctatgccag tccccagttc agggtttggc caagggtcaa atgagataat 1440  
ttcatggagg aaggcctggcc cgatTTTCT actgttttgc ggaagacagc ctcttcttct 1500  
tgtaactgca gccccagaaac ctgatctcca catccctgccc aggcaggtag ctgtgtacaa 1560  
gggcctcatct tccctggcccc aaccccaagct ctgatttgc tattcagggtg gtgtaaatac 1620  
ttctaccagg acctatttca agccatttgc atgtcccttgc ctggggagat gcaggcagc 1680  
acaccattta atatttccct cacatttcca ccccaatttgc cactcttttgc tgggagttgc 1740  
tgtctcagag ggttggcggt tctgggtggc caagaccata agtaatttac aaataacttag 1800  
gaagcgacgg gttttgagta tttattacct tttaaaaatg tactttgtgg cttaggcatgg 1860  
tggctcacgc ctgttagtccc cgcacccggga ggccgaggtagtgc ttgagctcag 1920  
gagttcaaga ccagccctggg caacacggcg aaaccccaatc tctaccaaaa atacacacac 1980  
acacacacac acacacacac acacacacac acacacacac acacacacac tggcctagcg 2040  
tgggtcgttgc tgcgttgcgttgc cgcagttact caggagacca aggttaggagg taggaaacca 2100  
aggttaggagg atcaccccgag gtcggtagtt cgagaccagc ctgaccaaca tggagaaacc 2160  
ctgtctttac taaaaataca aaattagctg ggcgtgggtgg tgcacatgcctg taattccagc 2220  
tacttggag gctgagacag gagaatggct tgaacccggaa aggcggagtt tgcgggtgagc 2280  
tgagatcgcg tcatatgcact ccagccctggg caacaagagc aaaactccgt ctccaaaaaaa 2340  
aagaaaatata tatataatatg tgcgtgtgtg tgcgtgtgtg tgcgtgtata tatataatatg 2400  
tatgtgtata tatataatatg tgcgtgtgtg tgcacatata tatataatact ttgtttaatt 2460  
gtaagtgtgt ttgtttaat ttgttataat gtcgtgtgtt aacagctggc tggcaagatt 2520  
cctgagaact gaagagtttgc ccccaagccca tccagcacac catggggccca gggcagaccc 2580  
tggggctagg cggtcttggg ttccagaggg ctcccatgc cctgtccttat tgcgttctgc 2640  
gcaataggac atttacgcgg ggggggggggg tggttcttgc ttctgggtct ttttagggac 2700  
tctgtgatta agaaacagca gggatgttgc aacagcaggatgaggatggg cctggggacg 2760



ggtcagtgaa gggctttcat tcctagctgc tgacctgatc tgccctgaga taaaagacta 2820  
agacccagag agtgaacgct gtccgcgggg gcagaagcga gtgaggcgic gggacagtgg 2880  
ggcataacca agagcaaaac gcaaactgag acttcagcgc cggttctcg ggccagccca 2940  
cgccctctgc ctcaagctcaa tgccactccc tccccgcaa gtggctctcc gctctggagg 3000  
cgggaccgag ttctccggtg gccccggag gctccggcag cgagctctgg gaggctggga 3060  
ggggagttag gggagggggcg ctgactgggc cggtccaaaga ggagggggcc ttaataggc 3120  
tcgcccagcg cctggcttgc tgcgctgcga gtggctgcgg ttgcgagaag ccgcccggca 3180  
ccttccgcta gttctcggt gcaaataatcc gtccttgcac ttgacagcga ttgtacttaa 3240  
gctcccaggg cgcgcttgc ttggaaaggc acaggttagga agcgcgggct gccgggtgca 3300  
cgctcgccgc cctgggagga gtctccctcc ctggctctc ctgtctggga actgcccggct 3360  
gtcccgtagc gtggcggtt ccagagtgcg ggctgcacgg agaccgcggc agcggccggta 3420  
gagcccggcc cagcccccttc ccacagcgcg gcgggtgcgt gcccggcgcc atg 3473

<210> 25

<211> 3467

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> promoter

<222>

<400> 25

ttgcacagct aagatctgggt ggaggcatgc acacagggcc ctctgaccat gggctctaaa 60  
tcactgtact atgttccctt ccataggcct caatcagtca tggatattt gaccctggc 120  
ttatcttagg tattatcttag accacagatt ttggatgcag ttctctggct gaagacctct 180  
gagcttaggat aacccttctt ctgttgcacag acgagtcaga gaatcagatc agtgtatgaa 240  
gtggagtgcc aatcctgagt atcacctcta ctcaagtgcgt caacatatcc ctatcctc 300  
aattccctgg caaaagtgtat tggatggAAC cacaggcttc caagagggga cagtcaagca 360  
ttaaatacga gaatgcacat ataactcttg gtgcgtgtt tagcacatac taagccgtca 420  
atacatgcta atcccttta gcaaataccac atggccagtt tctgtgtca ggggtgagaa 480  
tagctggcgt gtgattgggg cagggggagc actaagtggg agggacttcc tgcgtcagg 540  
ccctgcccattt ttgactgaca tgctgcagcc ctggccaaaa cccatgggtc agaatgaaag 600  
taaagtgcgg ttgaaaacct tgcaatccac ctgtttttact gcccgggtgtt gtaaaacaat 660  
tgctgtcccc aaataaatga ctatcattt ctgttgggtt tctgcgtttc tcttttaatta 720  
taggccccctt ttgaacgctc aaacacacag ggcctttgtt agcttgaact ccctgtctca 780







ctgcctcagc tcaatgccac tccctccccg ccaagtggct ctccgctctg gaggcgggac 3000  
cgagttctcc ggtggccct ggaggctccg gcagcgagct ctgggaggct gggagggag 3060  
tgaggggagg ggcgctgact gggccgtcca aagaggaggg ggccttaat aggctcgccc 3120  
agcgcctggc ttgctgcgt gcgagtggct gcgggttgcga gaagccgccc ggcacccccc 3180  
gctagttctc ggctgcaaat cttcgtcctt gcacttgaca gcgattgtac ttaagctccc 3240  
agggcgcgt ttgcttgaa aggacaggtt aggaagcgcg ggctgcccgg tgcacgcctcg 3300  
ccgcctggg aggagtcctc ctcccttggc tctccttctt gggaaactgcc ggctgtcccc 3360  
tagcgttggc ggttccagag tgccggctgc acggagaccg cggcagcggc cggagagccc 3420  
ggcccaaaaa cttccccacag cgcggcggtg cgctgccccgg cgccatg 3467

<210> 26

<211> 3464

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> promoter

<222>

<400> 26

ttgcacagct aagatctgggt ggaggcatgc acacagggcc ctctgaccat gggctctaaa 60  
tcactgtact atgttccctt ccataggccct caatcagtcata tgtaatattt gacctggctcg 120  
ttatcttagg tattatcttag accacagatt ttggatgcag ttctctggct gaagacctct 180  
gagctaggat aaccctctt ctttgacag acgagtcaaga gaatcagatc agtgcataaaaa 240  
gtggagtgcc aatccctgagt atcacctcta ctcaagtgcgtt caacatatacc ctagatccctc 300  
aattccctgg caaaagtgtat tggatggAAC cacaggcttc caagagggga cagtcaagca 360  
ttaaatacga gaatgcacat ataactcttgc tgcaatgtt tagcacatac taagccctgca 420  
atacatgcta atcccttgcata gcaaatccac atggccagtt tctgtgcgtca ggggtgagaa 480  
tagctggct gtgattgggg cagggggagc actaagtggg agggacttcc tgtctcagg 540  
ccctgcccattt ttgactgaca tgctgcagcc ctggccaaaa cccatgggtc agaatgaaag 600  
taaagtgcgg ttgaaaacct tgcaatccac cttaaaaact gcccgggtgtat gtaaaaacaat 660  
tgcttgcccc aaataaatgtat cttatcatttgc ctgttgggttgc tctgcgtttc tcttttaattt 720  
taggcctctt ttgaacgcgttcc aaacacacag ggcctttgtat agcttgcgttcc cccctgtctca 780  
cacacagtcc tcccataaccc atacactctc tttcatttgc agagtataaa caccatctc 840  
tcactcatttcc acataatgaa tttcagctcc ttgtgtccccca atcaaggaga ggcctcactg 900  
gaattatggg catctgagcc atcttcatgt tccaaaggcccc cagggggcgc ttcggggatg 960



ggatccctta tggggagaag ataatggca aaaagtgc ttcactgtat gaccaggccc 1020  
agcctttct ctccctggac aatagagttc ttcccttgaa cagccacttc cctaaaaaaa 1080  
attccaaaat tctcccacat catccccctt atgcttaaaa tcatcacaca ctcccttctt 1140  
tgtccctccc tcttgcaaac tcaactcaga gcccttggc tccagaaaga tttcttaggt 1200  
atcaggagag agtagcaaag cctccctcct ctccctgcct ttctcccttg tcagagaaag 1260  
aagttgattc tgccggagagg taagaaggat cttgaggtct agagcctgaa aaactccttg 1320  
ggctgttctc caaactagat gggaaacataa ggtgcgatttgc catcttcctcc agctgatact 1380  
cactcgccct cctatgccag tccccagtc agggtttgcgtaaagggtcaa atgagataat 1440  
ttcatggagg aagccctggcc cgattttct actgtttgc ggaagacagc ctcttcctct 1500  
tgtaactgca gccccagaac ctgatctcca catccctgccc aggcaggtag ctgtgtacaa 1560  
gggctcatct tcctgcccc aaccccaagct ctgatttgc tattcaggtg gtgtaaatac 1620  
ttctaccagg acctatttca agccatttgcgatgttgc ctggggagat gcagggcagc 1680  
acaccatttta atatttccct cacatttcca cccattctgcactcttgc tgggagttgc 1740  
tgtctcagag ggttggcggt tctggggcttcaagaccata agtaatttac aaatacttag 1800  
gaagcgcacgg gttttagtta ttattacct tttaaaaatg tactttgtgg cttaggcattgg 1860  
tggctcacgc ctgttagtccc cgccacggga ggccgagggtg ggtggatgc ttgagctcag 1920  
gagttcaaga ccagccctggg caacacggcg aaaccccaagtc tctaccaaaa atacacacac 1980  
acacacacac acacacacac acacacacac acacacacaa attggccatgc cgtgggtgc 2040  
tgtgtctgtg gtgcagtttca ctccaggagac caaggttagga ggttaggaaac caaggttagga 2100  
ggatcaccccg aggtcggttag ttccgagacca gcctgaccaa catggagaaa ccctgtctt 2160  
actaaaaata caaaatttgc tgggcgtgg tggcatgcc tgtaatttcca gctacttggg 2220  
aggctgagac aggagaatgg cttaaccccg gaaggcggag ttgcggtaga gctgagatgc 2280  
cgtcatttgc ctccagccctg ggcaacaaga gcaaaacccgcgtcaaaaaaaaagaaata 2340  
tatatatata tatgtgtgtg tttgtgtgtg tttgtgtatg tatatatata tatgtatgtg 2400  
tatatatatg tatgtgtgtg tttgtgtatg tttgtgtatg tttgtgtatg tttgtgtatg 2460  
gttttagtttta atttttata atgtccgtga ttacagctg gctggcaaga ttccctgagaa 2520  
ctgaagagtt tgccccagcc catccagcac accatgggcc cagggcagac ctggggctta 2580  
ggcggctttg ggttccagag ggctcccatg cccctgtctt attgctcttc tggcaatagg 2640  
acatttacgc ggggggggggg gttgggttcttgcattctggatgc tttagggga ctctgtgatt 2700  
aagaaacagc agggatgttg caacagcagg gatgagggtgg gcctgggac gggcgtgtga 2760  
agggtcttca ttccctagctg ctgacctgtat ctccctgag ataaaagact aagacccaga 2820  
gagtgaacgc tttccgcggg ggcagaagcg agtgaggcgt cggcacatgt gggcataacc 2880  
aagagcaaaa cgcaaaactga gacttcagcg ccgggttctc gggccagccc acgccttcctg 2940  
cctcagctca atgcctactcc ctccccggca agtggctctc cgctctggag gcgggaccga 3000  
gttctccgggt ggccccctggaa ggctccggca gcgagctctg ggaggctggg aggggagttga 3060  
ggggagggggc gctgacttggg ccgtccaaag agggggggc cttaatagg ctcccccagc 3120



gcctggcttg ctgcgctgcg agtggctgcg gttgcgagaa gccgcccggc accttccgct 3180  
agttctcgcc tgcaaatctt cgtccttgca cttgacagcg attgtactta agctcccagg 3240  
gcgcgccttg cttggaaagg cacaggttagg aagcgccggc tgccgggtgc acgctcgccg 3300  
ccctgggagg agtctccctc ccttggctct cctttctggg aactgcccggc tgtccctgt 3360  
cgttggcggt tccagagtgc gggctgcacg gagaccgcgg cagcggccgg agagcccg 3420  
ccagccccctt cccacagcgc ggcggtgcc tgcccggcgc catg 3464

<210> 27

<211> 3469

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> promoter

<222>

<400> 27

ttgcacagct aagatcttgtt ggaggcatgc acacagggcc ctctgaccat gggctctaaa 60  
tcactgtact atgttccctt ccataggcct caatcagtca tctaataattt gacctggctg 120  
ttatcttagg tattatcttag accacagatt ttggatgcag ttctctggct gaagacctct 180  
gagctaggat aacccttctt ctttgacag acgagtcaga gaatcagatc agtgcata 240  
gtggagtgcc aatcctgagt atcacctcta ctcaagtgc caacatatacc cttagatcc 300  
aattccctgg caaaagtgtat tggatgaaac cacaggcttc caagagggga cagtcaagca 360  
ttaaatacga gaatgcacat ataactcttg gtgcaatgtt tagcacatac taagcctgca 420  
atacatgcta atcccttga gcaaatccac atggccagtt tctgtgcctca ggggtgagaa 480  
tagctggct gtgattgggg cagggggagc actaagtggg agggacttcc tgtctcagg 540  
ccctgccttc ttgactgaca tgctgcagcc cttggccaaaa cccatgggtc agaatgaaag 600  
taaagtgcgg ttgaaaacct tgcaatccac ctttaaaact gccgggtgtta gtaaaacaat 660  
tgcttgcccc aaataaatga cttatcattt ctgttggttt tctgcgtttc tcttaatta 720  
tagggccctt ttaaacgcctc aaacacacag ggccttgcgta agcttgcactt ccctgtctca 780  
cacacagtcc tcccataccc atacactctc tttcatttgc agagtataaa caccatctc 840  
tcactcattt acataatgaa tttcagctcc ttgtgtccca atcaaggaga ggcctcactg 900  
gaattatggg catctgagcc atcttcatgt tccaaaggccc cagggggcgc ttccaagagt 960  
ggatccctta tggggagaag ataatggca aaaagtgc ttcactgttgc gaccagtccc 1020  
agcctttctt ctccctggac aatagagtcc ttcccttgcgaa cagccacttc cctaaaaaaa 1080  
attccaaaat tctccacat catccccctt atgcttaaaa tcatcacaca ctcccttctt 1140



tgtccccc tcttgcaaac tcaactcaga gcccittggc tccagaaaaga tttcttaggt 1200  
atcaggagag agtagcaaag cctccctcct ctccttgct ttctcccttg tcagagaaag 1260  
aagttagtc tgcggagagg taagaaggat cttgaggctc agagcctgaa aaactccctg 1320  
ggctgttctc caaactagat gggAACATAA ggtgcgattg catcttctcc agctgatact 1380  
cactcggcct cctatgcag tccccagtc agggTTTGGT caagggtcaa atgagataat 1440  
ttcatggagg aaggcctggcc cgattttct actgtttgct ggaagacagc ctcttcctct 1500  
tgtaactgca gccccagaac ctgatctcca catccctgcc aggcaggtag ctgtgtacaa 1560  
gggcitcatct tccctggccc aaccccaagct ctgatttgct tattcaggtg gtgtaaatac 1620  
ttctaccagg acctatttca agccatttgta atgtccctga ctggggagat gcagggcagc 1680  
acaccatita atatttcct cacatttcca ccccatctg cactctttc tgggagttgc 1740  
tgtctcagag ggttggcggt tctggggct caagaccata agtaattatc aaataacttag 1800  
gaagcgacgg gttttgagta tttattacct tttaaaaatg tactttgtgg ctggcatgg 1860  
tggctcacgc ctgttagtccc cgacccggga ggccgaggtg ggtggattgc ttgagctcag 1920  
gagttcaaga ccagcctggg caacacggcg aaacccagtc tctaccaaaa atacacacac 1980  
acacacacac acacacacac acacacacac acacacacac acaaattggc ctgcgtgg 2040  
gtcgtgtgtc tgggtcgca gttactcagg agaccaaggt aggaggtagg aaaccaaggt 2100  
aggaggatca cccgaggtcg gtatitcag accagcctga ccaacatgga gaaaccctgt 2160  
ctttactaaa aatacaaaaat tagctggcg tggtggtgca tgcctgtaat tccagctact 2220  
tgggaggctg agacaggaga atggcttgaa cccggaaggc. ggagtttgcg gtgagctgag 2280  
atcgctcat tgcactccag cctggcaac aagagcaaaa ctccgtcica aaaaaaaaaga 2340  
aatatatata tataatgtgt tgggtgtgt tgggtgtgt tataatata tataatgtatg 2400  
tgtatata tataatgtgt tgggtgtgca tataatata tacactttgt ttaattgtaa 2460  
gtgtgtttag tttaattttt aataatgtcc gtgattaaca gctggctggc aagattcctg 2520  
agaactgaag agtttcccc agcccatcca gcacaccatg ggcccaaggc agacctggg 2580  
gctaggcgtt cttgggttcc agagggctcc catgcccctg tcctattgct ctctggcaa 2640  
taggacattt acgcgggggg ggggggtgg tcttgattct gggctttta gggactctg 2700  
tgattaagaa acagcagggaa tggcaaca gcagggatga ggtggccctg gggacgggtc 2760  
agtgaagggt ctccattcct agctgctgac ctgatctgcc ctgagataaa agactaagac 2820  
ccagagagtg aacgcgttcc gcggggcag aagcgagtgaa ggcgtcgga cagtggggca 2880  
taaccaagag caaaacgcaa actgagactt cagcgccgt ttctgggccc agcccacgcc 2940  
tcctgcctca gctcaatgcc actccctccc cgccaaatgg ctctccgctc tggaggcggg 3000  
accgagttct ccgggtggccc ctggaggctc cggcagcgag ctctgggagg ctgggagggg 3060  
agtgagggga ggggcgttca ctggccgtc caaagaggag gggccctta ataggctcgc 3120  
ccagcgcctg gcttgctgctc ctgcgagtggt ctgcgttgc gagaagccgc ccggcacctt 3180  
ccgcctgttcc tcggctgcaa atcttcgtcc ttgcacttga cagcgattgt acttaagctc 3240  
ccagggcgcg ctggcttgg aaaggcacag gtaggaagcg cggcgtcccg ggtgcacgct 3300



cgccgcccggggaggctcccttg gctctccctt ctgggaactg ccggctgtcc 3360  
cgttagcggttgcgggttccag agtgcgggct gcacggagac cgccgcagcg gccggagagc 3420  
ccggcccaagcccttccac agcgccggcggtgcgtgccc ggcgcctatg 3469

<210> 28

<211> 3470

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> promoter

<222>

<400> 28

ttgcacagct aagatctgggt ggaggcatgc acacagggcc ctctgaccat gggctctaaa 60  
tcactgtact atgttccctt ccataggcct caatcagtca tctaataattt gaccctgggtcg 120  
ttatcttagg tattatcttag accacagatt ttggatgcag ttctctggct gaagacctct 180  
gagcttaggat accccttctc tttgacaga cgagtcagag aatcagatca gtgatagaag 240  
tggagtgccta atccctgagta tcacccctac tcaagtgcac aacatatccc tagatcctca 300  
attccctggc aaaagtgtt ggttggaaacc acaggcttcc aagaggggac agtcaagcat 360  
taaatacgag aatgcacata taactcttgg tgcaatgttt agcacatact aagcctgcaa 420  
tacatgctaa tcccttttag caaatccaca tggccagttt ctgtgctcag gggtgagaat 480  
agctgggctg tgattggggc agggggagca ctaagtggga gggacttccct gtctcaggc 540  
cctgccatct tgactgacat gctgcagccc ttgcacaaac ccatgggtca gaatgaaagt 600  
aaagtgcgt tgaaaacctt gcaatccacc tttaaaactg cgggtgttag taaaacaatt 660  
gcttgccccca aataaatgac ttatcattgc tgggtttgt ctgcgtttct cttaattat 720  
aggcccttctt tgaacgcctca aacacacagg gcctttgtaa gcttgaactc cctgtctcac 780  
acacagtcct cccataccca tacactcttct ttcatttgca gagtataaac acccatctct 840  
cactcattca cataatgaat ttcagcttccct tgggtccaa tcaaggagag gcctcactgg 900  
aattatgggc atctgagcca tcttcattgtt ccaagggccc agggggcgct tccaagagtg 960  
gatcctttat ggggagaaga taatgggcaa aaagtgcctt tcaactgtatgg accagtccca 1020  
gcctttctc tccttggaca atagagttct tcccttgcac agccacttcc ctaaaaaaaaa 1080  
ttccaaaatt ctcccacatc atccccctta tgcttaaaat catcacacac tcccttcttt 1140  
gtcctccctt cttgcaaaact caactcagag ccctttggct ccagaaagat tttcttaggt 1200  
tcaggagaga gtagcaaaagc ctcccttcctc tccttgcctt tctcccttgc cagagaaaga 1260  
agttgattct gcggagaggt aagaaggatc ttgaggtcta gaggctgaaa aactcccttgg 1320



gctgttctcc aaactagatg ggaacataag gtgcgattgc atcttctcca gctgatactc 1380  
actcggcctc ctatgccagt ccccagtccca gggtttggtc aagggtcaaa tgagataatt 1440  
tcatggagga agcctggccc gattttcta ctgtttgctg gaagacagcc tcttcctctt 1500  
gtaactgcag ccccagaacc tgatctccac atccctgcca ggcaggtgc tgigtacaag 1560  
ggctcatctt cctgccccca accccagctc tgatttgcatt cttcaggtagg tgtaaatact 1620  
tctaccagga cctatttcaa gccattgtga tgccttgcac tggggagatg cagggcagca 1680  
caccatttaa tatttccctc acatttccac cccattctgc actctttctt gggagttgct 1740  
gtctcagagg gttggcggtt ctggcggctc aagaccataa gtaattatca aatacttagg 1800  
aagcgcggg tttttagtat ttattacctt ttaaaaatgt actttgtggc taggcattgt 1860  
ggctcacgcc ttagtcccc gcacccggag gccgaggtagg gtggattgct tgagctcagg 1920  
agttcaagac cagcctgggc aacacggcga aaccaggctc ctacaaaaaa tacacacacaca 1980  
cacacacaca cacacacaca cacacacaca cacacacaca caaattggcc tagcgtggtg 2040  
tcgtgtgtct gtggtcgcag ttactcagga gaccaaggta ggaggttagga aaccaaggta 2100  
ggaggatcac ccgcaggctcg tagttcgaga ccagccctgac caacatggag aaaccctgtc 2160  
tttactaaaa atacaaaatt agctggcgt ggtggtgcatt gcctgttaatt ccagctactt 2220  
gggaggctga gacaggagaa tggcttgaac ccggaaaggcg gagtttgcgg tgagctgaga 2280  
tcgcgtcatt gcactccagc ctggcaaca agagcaaaac tccgtctcaa aaaaaaagaa 2340  
atatatatat atatgtgtgt gtgtgtgtat gtatatatat atatgtatgt 2400  
gtatatatat gtatgtgtgt gtgtgtgcatt atatatatat acactttgtt taattgtaaag 2460  
tgtgtttat ttaattttta ataatgtccg tgattaacag ctggctggca agattcctga 2520  
gaactgaaga gtttgcucca gcccattccag cacaccatgg gcccaggcgca gaccttgggg 2580  
ctaggcggtc ttgggttcca gagggctccc atgcccctgt cctattgctc ttctggcaat 2640  
aggacattta cgcggggggg ggggggggtgg ttcttgattc tgggtctttt aggggactct 2700  
gtgattaaga aacagcaggg attttgcac acgcaggatg aggtgggcct ggggacgggt 2760  
cagtaaggg tcttcatttc tagctgcgtc cctgatctgc cctgagataa aagactaaga 2820  
cccagagagt gaacgcgtc cggggggca gaagcgagtg aggctcggtt acagtggggc 2880  
ataaccaaga gcaaaacgca aactgagact tcagcggcgg tttctcggtt cagcccacgc 2940  
ctccctgcctc agctcaatgc cactccctcc cggccaagtgc gctctccgct ctggaggcgg 3000  
gaccgagttc tccggtgcc cctggaggct cggcagcga gctctggag gctgggaggg 3060  
gagtgggggg aggggcgtt actggggcgtt ccaaagagga gggggccctt aataggctcg 3120  
cccagcgctt ggcttgcgtc gctgcgttgc gctgcgttgc cggagccg cccggcacct 3180  
tccgcttagtt ctggctgcata aatcttcgtc cttgcacttg acagcgattt tacttaagct 3240  
cccagggcgc gccttgcgtt gaaaggcaca ggttaggaagc gcccggctgccc gggtgacgc 3300  
tcgcccgcctt gggaggagtc tccctccctt ggctctccctt tctgggaact gcccggctgtc 3360  
ccgttagcgtt ggccgttcca gagtgccggc tgcacggaga cccggcggcagc gcccggagag 3420  
cccgccccag ccccttccca cagcgcggcg gtgcgtgccc cggcgccatg 3470



<210> 29  
<211> 3467  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> promoter  
<222>

<400> 29

ttgcacagct aagatctgggt ggaggcatgc acacagggcc ctctgaccat gggctctaaa 60  
tcacigtact atgttccctt ccataggcct caatcagtcg tctaataattt gacctggtcg 120  
ttatcttagg tattatcttag accacagatt ttggatgcag ttctctggct gaagacctct 180  
gagcttaggat aacccctctt ctttgacag acgagtccaga gaatcagatc agtgcata 240  
gtggagtgcc aatcctgagt atcacctcta ctcaagtgcg caacatatcc ctagatcctc 300  
aattccctgg caaaagtgtat tggatggAAC cacaggcttc caagagggga cagtcaagca 360  
ttaaatacga gaatgcacat ataactcttg gtgcaatgtt tagcacatac taagcctgca 420  
atacatgcta atcccttga gcaaattccac atggccagtt tctgtgcgtca ggggtgagaa 480  
tagctgggct gtgattgggg cagggggagc actaagtggg agggacttcc tgtctcagg 540  
ccctgcccattt ttgactgaca tgctgcagcc ctggccaaaa cccatgggtc agaatgaaag 600  
taaagtggcg ttgaaaacct tgcataccac cttaaaaact gccgggtgtt gtaaaacaat 660  
tgcttgcccc aaataaatga ctatcatttgc ctgttggtttgc tctgcgtttc tcttttaattt 720  
taggcccattt ttgaacgctc aaacacacag ggcctttgtt agcttgaact ccctgtctca 780  
cacacagtcc tcccataccctt atacactctc ttccatttgc agagtataaa caccatctc 840  
tcactcatttcc acataatgaa tttagtgcgtcc ttgtgtccca atcaaggaga ggcctcacttgc 900  
gaattatggg catctgagcc atcttcatgt tccaaaggccc cagggggcgc ttccaaagagt 960  
ggatcccttta tggggagaag ataatggca aaaagtgcgtcc ttcaactgttgc gaccagtccc 1020  
agccctttctt ctccttgac aatagagtcc ttcccttgcgaa cagccacttc cctaaaaaaa 1080  
attccaaaaat tctccacat cttccctttt atgcattttttt tcatcacaca ctccttctt 1140  
tgtccctcccccc tcttgcaac tcaactcaga gccccttggc tccagaaaga ttttcttaggt 1200  
atcaggagag agtagcaaag cttcccttccctt ctccttgccctt ttctcccttgc tcaagagaaag 1260  
aagggttgcgtcc caaaacttagat gggAACataa ggtgcgttttgcgaa aactcccttgc 1320  
ggctgttgcgtcc caaaacttagat gggAACataa ggtgcgttttgcgatttgcgaa aactcccttgc 1380  
cactcggccctt cctatgcgtcc tcccttgcgtcc aggggttgcgatttgcgaa aactcccttgc 1440  
ttcatggagg aaggcctggcc cgtttttctt actgtttgcgatttgcgaa aactcccttgc 1500



tgtaactgca gccccagaac ctgatctcca catccctgcc aggcaggtag ctgtgtacaa 1560  
gggctcatct tccctgcccc aaccccagct ctgatttgct tattcaggtg gtgtaaatac 1620  
ttctaccagg acctatttca agccattgtg atgtccctga ctggggagat gcagggcagc 1680  
acaccattn atattccct cacatttcca cccattctg cacttttc tgggagttgc 1740  
tgtctcagag ggttggcggt tctggtggtt caagaccata agtaattatc aaatacttag 1800  
gaagcgcacgg gtttigagta ttattacct tttaaaaatg tactttgtgg ctaggcattgg 1860  
tggctcacgc ctgttagtccc cgcacccggga ggccgagggtg ggtggattgc ttgagctcag 1920  
gagttcaaga ccagcctggg caacacggcg aaacccagtc tctaccaaaa atacacacac 1980  
acacacacac acacacacac acacacacac acacacacac acaaattggc ctagcgtgg 2040  
gtcgtgtgtc tgggtcgca gttactcagg agacccaaggt aggaggtagg aaaccaaggt 2100  
aggaggatca cccgagggtcg gtagttcgag accagcctga ccaacatggg gaaacccgt 2160  
ctttactaaa aatacaaaaat tagctggcg tgggttgca tgcctgttaat tccagctact 2220  
tgggaggctg agacaggaga atggcttggaa cccggaaaggc ggagtttgcg gtgagctgag 2280  
atcgcgtcat tgcactccag cctggcaac aagagcaaaa ctccgtctca aaaaaaaaaga 2340  
aatatatata tataatgtgtg tgggtgtgtg tgggtgtgtg tataatata tataatgtta 2400  
tgtgtatata tataatgtgtg tgggtgtgtg catatatata tacactttgt ttaattgtaa 2460  
gtgtgttttag ttaattttt aataatgtcc gtgattaaca gctggctggc aagattccgt 2520  
agaactgaag agtttgccttcc agcccatcca gcacaccatg ggcccgaggc agaccttggg 2580  
gctaggcggt ctgggttcc agagggctcc catgcccctg tcctattgtc ttctggcaa 2640  
taggacattt acgcgggggg ggggtgggttc ttgattctgg gtcttttagg ggactctgtg 2700  
attaagaaac agcagggatg ttgcaacagc agggatgagg tggcctgg gacgggtcag 2760  
tgaagggtct tcattccctag ctgcgtgaccc gatctccct gagataaaag actaagaccc 2820  
agagagtgaa cgctgtccgc gggggcagaa gcgagtgagg cgtcgggaca gtggggcata 2880  
accaagagca aaacgcaaac tgagacttca gcccgggttt ctcggccag cccacgcctc 2940  
ctgcctcagc tcaatgccac tccctccccg ccaagtggtc ctccgctctg gaggcgggac 3000  
cgagttctcc ggtggccctt ggaggctccg gcagcgagct ctgggaggct gggaggggag 3060  
tgagggagg ggcgtgact gggccgtcca aagaggagg ggccttaat aggctcgccc 3120  
agcgcctggc ttgctgcgtc gcgagtggct gcccgggtca gaagccgccc ggcacccctcc 3180  
gctagttctc ggctgcaaat cttcgccctt gcacttgaca gcgattgtac ttaagctccc 3240  
agggcgcgtt tggcttgaa aggcacaggt aggaagcgcg ggctggccggg tgcacgcgtc 3300  
ccgccttggg aggagtctcc ctcccttggc tctcccttct gggactgccc ggctgtcccg 3360  
tagcggttggc ggttccagag tgccggctgc acggagaccg cggcagcgcc cggagagccc 3420  
ggcccgcccc cttcccacag cgcggcggtg cgctgcccgg cgccatg 3467

&lt;210&gt; 30

&lt;211&gt; 3462



<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> promoter

<222>

<400> 30

ttgcacagct aagatctggg ggaggcatgc acacagggcc ctctgaccat gggctctaaa 60  
tcactgtact atgttccctt ccataggcct caatcagtc tgtaatattt gacccgtgtcg 120  
ttatcttagg tattatctag accacagatt ttggatgcag ttctctggct gaagacctct 180  
gagcttaggat aacccttct ctttgacag acgagtcaga gaatcagatc agtgcataaa 240  
gtggagtgcc aatccctgagt atcacctcta ctcaagtgc tcaacatatcc ctagatcc 300  
aattccctgg caaaagtgtat tggatggaac cacaggcttc caagagggga cagtcaagca 360  
ttaaatacga gaatgcacat ataactcttg gtgcaatgtt tagcacatac taagccgtca 420  
atacatgcta atccctttga gcaaattccac atggccagtt tctgtgc tca ggggtgagaa 480  
tagctggct gtgattgggg cagggggagc actaagtggg agggacttcc tgcgtcagg 540  
ccctgcccattc ttgactgaca tgctgcagcc ctggccaaaa cccatgggtc agaatgaaag 600  
taaagtgcgc tggaaaacct tgcaatccac cttaaaaact gcccgggtgt aaaaaacaat 660  
tgcttgcccc aaataaatga cttatcattt ctgttgggt tctgcgttcc tcttttaatta 720  
tagggccctt ttgaacgc tccacacacag ggcctttgtt agcttgaact ccctgtctca 780  
cacacagtc tccatcaccc atacactctc ttcatatttgc agagtataaa caccatctc 840  
tcactcattt acataatgaa ttccatgtcc ttgtgtccca atcaaggaga ggccttactg 900  
gaattatggg catctgagcc atcttcatgt tccaaaggccc cagggggcgc ttccaagagt 960  
ggatcccttta tggggagaag ataatggca aaaagtgc ttcactgtat gaccaggccc 1020  
agccctttctt ctccttggac aatagagttc ttcccttggaa cagccacttcc cttttttttt 1080  
atccaaaaat tctccacat catccccctt atgtttttt tcatcacaca ctcccttctt 1140  
tgtccctcccc tcttgcaaaac tcaactcaga gccccttggc tccagaaaga ttttcttaggt 1200  
atcaggagag agtagcaaaag cctcccttcc tcccttgc ttcctccctt tcaagagaaag 1260  
aagtgtattt tgcggagagg taagaaggat ttgggtctt agaggccat gaaactccctt 1320  
ggctgttctc caaacttagat gggAACATAA ggtgcgtttt catcttctcc agctgtataact 1380  
cactcggccctt cctatgcac tcccccttgc aggggtttgtt caagggtcaa atgagataat 1440  
ttcatggagg aaggccctggcc cgtttttctt acgttttgc tggaaagacagc ctcttccctt 1500  
tgtaactgca gccccagaaac ctgatctcca catccctgccc aggcaggtag ctgtgtacaa 1560  
gggcctcatct tccctggcccc aacccttgc tggatgttgc tattcagggtg gtgtaaatac 1620  
ttctaccagg acctatttca agccatttgc atgtccctga ctggggagat gcaggccagc 1680



acaccattta atattccct cacattcca ccccattctg cactcttgc tgggagttgc 1740  
tgtctcagag ggttggcggt tctggggct caagaccata agtaattatc aaatacttag 1800  
gaagcgacgg gtttgagta ttattacct tttaaaaatg tacttggcttgg cttaggcattgg 1860  
tggctcacgc ctgttagtccc cgccacggga ggccgaggtt ggtggattgc ttgagctcag 1920  
gagttcaaga ccagcctggg caacacggcg aaacccagtc tctacaaaaa atacacacac 1980  
acacacacac acacacacac acacacacac acacacacaa attggcttag cgtgggtcg 2040  
tgtgtctgtg gtccgagttt ctcaggagac caaggttagg ggttagaaac caaggttagg 2100  
ggatcaccgg aggtcggtt ttcgagacca gcttgaccaa catggagaaa ccctgtctt 2160  
actaaaaata caaaatttgc tggcggtt ggtgcattgc ttaatttcca gctacttggg 2220  
aggctgagac aggagaatgg cttaaccccg gaaggcggag tttgcgttga gctgagatcg 2280  
cgtcattgca ctccagcctg ggcaacaaga gcaaaactcc gtcacaaaaa aaaagaaata 2340  
tatatatata tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtatgtatata tttatata tgtatgtgt 2400  
tatatatatgtatata tttatataata atgtccgttga ttaacagctg gctggcaaga ttcctgagaa 2460  
gtttagtttta atttttaata atgtccgttga ttaacagctg gctggcaaga ttcctgagaa 2520  
ctgaagagtt tgccccagcc catccagcac accatgggccc cagggcagac ctggggcta 2580  
ggcggcttgg ggttccagag ggctccatg cccctgtctt attgccttc tggcaatagg 2640  
acatttacgc ggggggggt ggttcttgat tctgggtctt ttagggact ctgtgattaa 2700  
gaaacagcag ggtatgttgc acagcaggga tgagggtggc ctggggacgg gtcagtgaag 2760  
ggtcttcatt cctagctgtt gacctgtatctt gcccctgat gaaactaa gacccagaga 2820  
gtgaacgctg tccgcgggg cagaagcgag tgaggcgtcg ggacagtggg gcataaccaa 2880  
gagcaaaacg caaactgaga cttagcgtcc ggtttctcg gccagccac gcctccgtcc 2940  
tcagctcaat gccactccct ccccgccaag tggctctccg ctctggaggc gggaccgagt 3000  
tctccgggtgg cccctggagg ctccggcagc gagctctggg aggctggag gggagtgagg 3060  
ggagggcgcc tgaactggcc gtccaaagag gagggggccct ttaataggct cgcccagcgc 3120  
ctggcttgcgt ggcgtcgag tggctgggt tgcgagaagc cggccggcac ctccgcgt 3180  
ttctcggctg caaatcttcg tccttgcact tgatagcgat tgacttaag ctcccaggcc 3240  
gcccgttgcgt tggaaaggca caggttagaa ggcgggctg cgggtgcac gtcgcccggcc 3300  
ctgggaggag tctccctccc ttggctctcc ttctggaa ctggccgttgc tccctgttgc 3360  
ttggcggttc cagagtgcgg gctgcacggaa gaccgcggca gcccgggag agcccgcccc 3420  
agcccccttcc cacagcgccgg cgggtgcgttgc cccggccca tg 3462

〈210〉 31

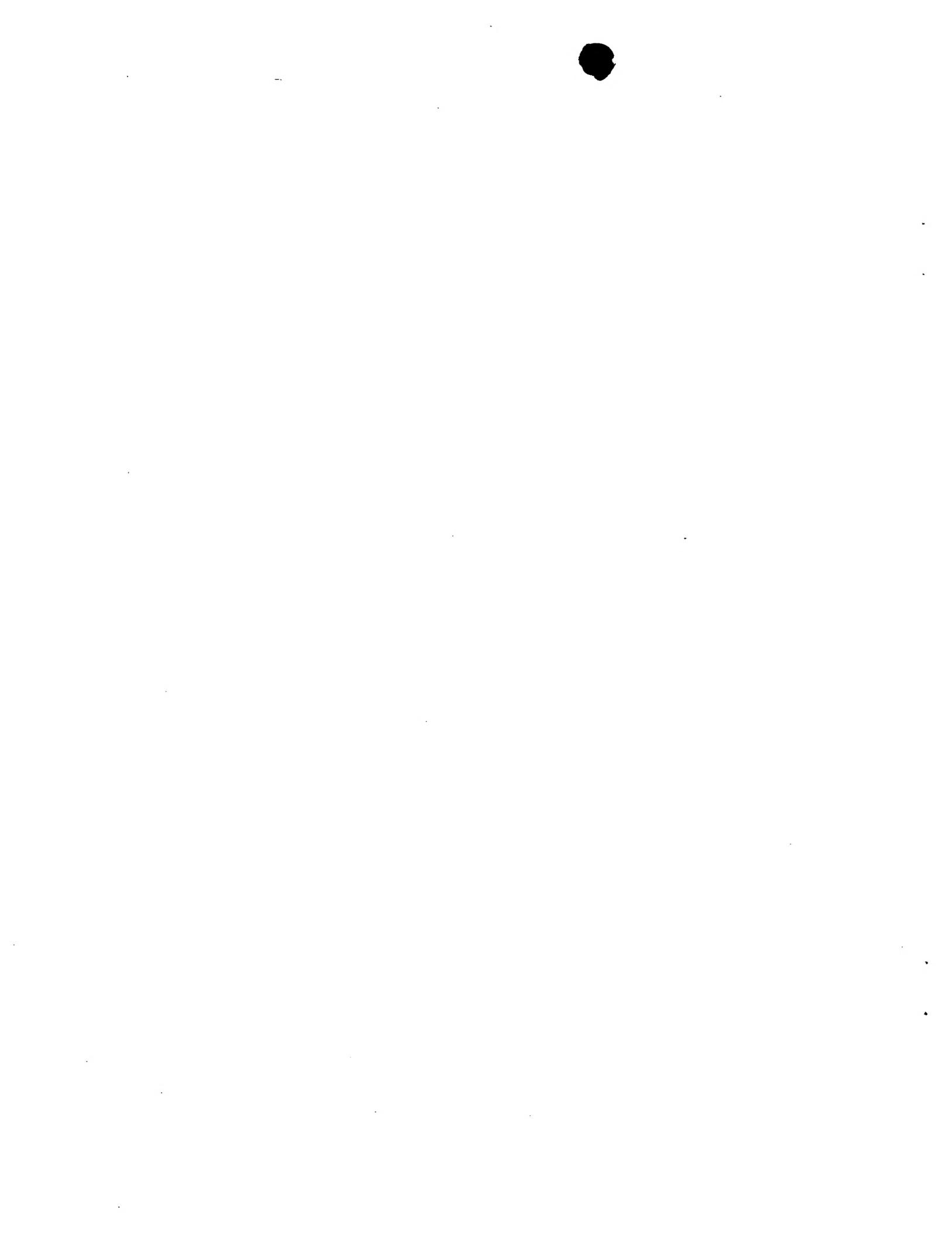
〈211〉 3455

<212> DNA

<213> Homo sapiens

3462

<220>



WO 01/34785

⟨221⟩ promoter  
⟨222⟩

⟨400⟩ 31

ttgcacatcc  
tcactgtact atgtccctt  
ttatcttagg tattatcttag accacagat  
gagcttagat aacccttctt ctttgacag acggatca  
gaggatgcc aatccgtat ataccctctt ctaaagtgtt caacata  
aatttccctgg caaaagtgtt tggatggac cacaggcttc caaggggg  
ttaaatacgtt atcccttgg gcaaatccac aigggcgtt tagcacatac taagccctgca 420  
atacatgttta atcccttgg gcaaatccac aigggcgtt tagcacatac taagccctgca 480  
tagctgggtt tgactgaca tgcaatccac cttttaaaact cccatgggtc agaaatgaaag 600  
ccctgccc tggatgggg ctttgccaaact cttttaaaact cccatgggtc agaaatgaaag 540  
taaagtgcctt tggatgggg ctttgccaaact cccatgggtc agaaatgaaag 660  
tgcttgcccc aataaaatgtt cttatcatgtt cttttaaaact cccatgggtc agaaatgaaag 720  
taggccttct tggatgggg ctttgccaaact cccatgggtc agaaatgaaag 780  
cacacgtcc tcccatacc accacacac cttttaaaact cccatgggtc agaaatgaaag 840  
tcaatcatttccatgtt cttttaaaact cccatgggtc agaaatgaaag 900  
gaattatggg tggggagaat tttcaatggc accatgtt cttttaaaact cccatgggtc agaaatgaaag 1020  
ggatcccttta tggggagaat tttcaatggc accatgtt cttttaaaact cccatgggtc agaaatgaaag 1080  
acgtttttctt cttttaaaact cccatgggtc agaaatgaaag 1140.  
atccaaat tttccatgtt cttttaaaact cccatgggtc agaaatgaaag 1200  
tgtccccc tttccatgtt cttttaaaact cccatgggtc agaaatgaaag 1260  
atcggagat agtagcaaaat tttccatgtt cttttaaaact cccatgggtc agaaatgaaag 1320  
aagggtttttccatgtt cttttaaaact cccatgggtc agaaatgaaag 1380  
tgttggatccatgtt cttttaaaact cccatgggtc agaaatgaaag 1440  
ggctgtttccatgtt cttttaaaact cccatgggtc agaaatgaaag 1500  
tccatgttccatgtt cttttaaaact cccatgggtc agaaatgaaag 1560  
tgatccatgtt cttttaaaact cccatgggtc agaaatgaaag 1620  
ggatccatgtt cttttaaaact cccatgggtc agaaatgaaag 1680  
tgcgtttccatgtt cttttaaaact cccatgggtc agaaatgaaag 1740  
acaccattttttccatgtt cttttaaaact cccatgggtc agaaatgaaag 1800  
tgttccatgtt cttttaaaact cccatgggtc agaaatgaaag 1860  
gaagccatgtt cttttaaaact cccatgggtc agaaatgaaag 1920



gagtcaaga ccagcctggg caacacggcg aaacccagtc tctaccaaaa atacacacac 1980  
acacacacac acacacacac acacacacac acacacaaaat tggcttagcg tggtgtcg 2040  
tgtctgtggt cgcgattact caggagacca aggttaggagg taggaaacca aggttaggagg 2100  
atcacccgag gtcggtagtt cgagaccagc ctgaccaaca tggagaaacc ctgtcttac 2160  
taaaaataca aaattagctg ggcgtggtgg tgcacatgcctg taattccagc tacttgggag 2220  
gctgagacag gagaatggct tgaacccgga aggccggagtt tgcggtgagc tgagatcg 2280  
tcattgcact ccagcctggg caacaagagc aaaactccgt ctcaaaaaaa aaaaaatata 2340  
tatataatgtg tgggtgtgtg tgggtgtgtg tatgtatata tatataatgtt tgggtatata 2400  
tatgtatgtg tgggtgtgtca tatataatata tacactttgt ttaattgtaa gtgggttttag 2460  
tttaattttt aataatgtcc gtgattaaca gctggctggc aagattcctg agaactgaag 2520  
agtttgcggcc agcccatcca gcacaccatg ggcccaggc agacccctgg gcttaggcgt 2580  
cttgggttcc agagggctcc catgcccctg tcctattgtc cttctggcaa taggacattt 2640  
acgcgggggg gggtggttctt gattctgggt cttttagggg actctgtgat taagaaacag 2700  
cagggatgtt gcaacacgagc ggatgagggtg ggcctggga cgggtcagtg aagggttttc 2760  
attcctagct gctgaccctga tctgcccctga gataaaagac taagacccag agagtgaacg 2820  
ctgtccgcgg gggcagaagc gagtgaggcg tcgggacagt ggggcataac caagagcaaa 2880  
acgcaaactg agacttcagc gcccgtttct cgggcccagcc caccccttc gcttcagctc 2940  
aatgccactc cctccccgcc aagtggctct ccgcctcgaa ggcgggaccg agttctccgg 3000  
tggcccccgg aggctccggc agcgagctct gggaggctgg gagggggagtg agggggagggg 3060  
cgctgactgg gccgtccaaa gaggaggggg ccttaataag gctcgcccaag cccctggctt 3120  
gctgcgcgtc gagtggtgtc ggttgcgaga agccgcccgg cacctccgc tagttctcgg 3180  
ctgcaaatct tcgtccctgc acttgacagc gattgtactt aagctccag ggcgcgttt 3240  
gcttgaaag gcacaggtag gaagcgcggg ctgcccgggtg cacgctcgcc gcccctggag 3300  
gagtctccct cccttggctc tcctttctgg gaactgcccgg ctgtccctgt a gcttggcgg 3360  
ttccagagtg cgggcgtcac ggagaccgcg gcagcggccg gagagcccgg cccagccct 3420  
tcccacagcg cggcggtgcg ctgcccggcg ccatg 3455

<210> 32

<211> 11

<212> Peptide

<213> Homo sapiens

<400> 32

Ala Arg Gly ser Val Val Leu thr Ala Lys Cys



<210> 33

<211> 13

<212> Peptide

<213> Homo sapiens

<400> 33

Gly Ser Ala Ala Ala Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

1 5 10

<210> 34

<211> 38

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 34

agagcggccg cctgctggct cagggtgtag ctggcgcc

38

<210> 35

<211> 38

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 35

agagcggccg cggAACCATC caccTGTGC ttgttgag

38



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/07917

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N 9/48, C12N 15/57, C12N 5/10, C07K 16/40, C12Q 1/34, A61K 38/48,  
A61P 19/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N 9/48, C12N 15/57, C12N 5/10, C07K 16/40, C12Q 1/34, A61K 38/48,  
A61P 19/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS, CAS ONLINE, DDBJ/GenBank/EMBL/Geneseq

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Flannery CR et al., "Expression of ADAMTS homologues in articular cartilage," Biochem Biophys Res Commun. Vol. 260 (July 1999) pp.318-22.	1-11
X	Abbaszade I et al., "Cloning and characterization of ADAMTS11, an aggrecanase from the ADAMTS family." J Biol Chem. Vol. 274 (August 1999) pp.23443-50.	1-11
X	Tortorella MD et al., "Purification and cloning of aggrecanase-1: a member of the ADAMTS family of proteins." Science. Vol. 284 (June 1999) pp.1664-6.	1-11

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

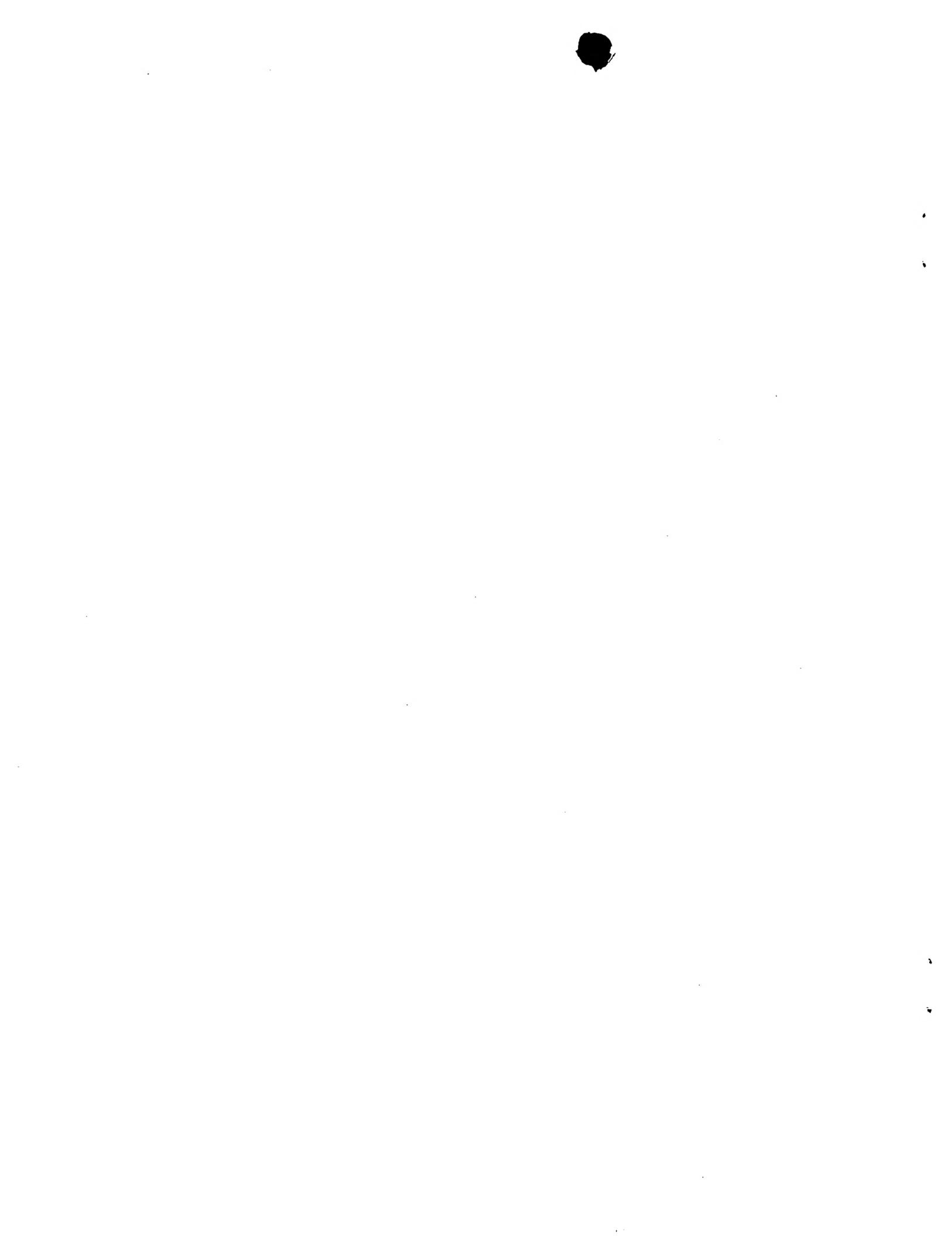
"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
06 February, 2001 (06.02.01)Date of mailing of the international search report  
06 March, 2001 (06.03.01)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C12N 9/48, C12N 15/57, C12N 5/10, C07K 16/40, C12Q 1/34, A61K 38/48, A61P 19/02

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C12N 9/48, C12N 15/57, C12N 5/10, C07K 16/40, C12Q 1/34, A61K 38/48, A61P 19/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS, CAS ONLINE, DDBJ/GenBank/EMBL/Geneseq

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Flannery CR et al. "Expression of ADAMTS homologues in articular cartilage." Biochem Biophys Res Commun. 第260巻 (1999 Jul) p. 318-22.	1-11
X	Abbaszade I et al. "Cloning and characterization of ADAMTS11, an aggrecanase from the ADAMTS family." J Biol Chem. 第274巻 (1999 Aug) p. 23443-50.	1-11
X	Tortorella MD et al. "Purification and cloning of aggrecanase -1: a member of the ADAMTS family of proteins."	1-11

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献  
 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 06.02.01	国際調査報告の発送日 06.03.01
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 加藤 浩 印 4B 9050 電話番号 03-3581-1101 内線 3448

## C (続き) 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
	Science. 第284巻 (1999 Jun) p. 1664-6.	

Ref. A

Claim

1. A metalloprotease having an aggrecanase activity, which comprises an amino acid sequence of from the 213th position to the 583rd position of an amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1, or an equivalent of said metalloprotease.

2. A metalloprotease having an aggrecanase activity, which comprises an amino acid sequence of from the 1st position to the 583rd position of an amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1, or an equivalent of said metalloprotease.

3. A metalloprotease having an aggrecanase activity, which consists of an amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1, an amino acid sequence of from the 1st position to the 687th position of the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1, an amino acid sequence of from the 1st position to the 583rd position of the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1, an amino acid sequence of from the 213th position to the 950th position of the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1, an amino acid sequence of from the 213th position to the 687th position of the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1 or an amino acid sequence of from the 213th position to the 583rd position of the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1, or an equivalent of said metalloprotease.



4. A gene which encodes an amino acid sequence of the metalloprotease having an aggrecanase activity described in any one of claims 1 to 3 or an amino acid sequence of an equivalent of said metalloprotease.

5 5. A vector which comprises the gene described in claim 4.

6. A host cell which comprises the vector described in claim 5.

7. A method for producing the metalloprotease 10 having an aggrecanase activity described in any one of claims 1 to 3 or an equivalent of said metalloprotease, which comprises using the host cell described in claim 6.

8. An antibody against the metalloprotease having an aggrecanase activity described in any one of claims 1 to 15 3 or an equivalent of said metalloprotease.

9. A method for screening a substance capable of inhibiting an aggrecanase activity of a metalloprotease, which comprises allowing the metalloprotease having an aggrecanase activity described in any one of claims 1 to 3 20 or an equivalent of said metalloprotease to contact with a compound to be tested.

10. A pharmaceutical composition for inhibiting degradation of proteoglycans, which comprises a substance capable of inhibiting the metalloprotease having an 25 aggrecanase activity described in any one of claims 1 to 3



or an equivalent of said metalloprotease, as an active ingredient.

11. A gene represented by SEQ ID NO:24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 or 31, or an equivalent of said gene.



**Explanation under the provisions of Convention 19(1)**

In Claims 1 to 3, "equivalent of said metalloprotease" was replaced with the definitions 5 described in the specification, which clarifies that the present invention is greatly different from the references.

Claims 4 and 7 to 10 were amended to conform with the above amendments.

In Claim 11, "equivalent of said gene" was replaced 10 with the definitions described in the specification, which clarifies the scope of the claim.

